



FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

TESIS DOCTORAL

**Avances en el control de la contaminación por
metales: nuevas metodologías de análisis y
especiación metálica en sistemas acuáticos.
Estudios en la Bahía de Algeciras**

MARGARITA ISABEL DÍAZ DE ALBA

Cádiz, 2013

**Avances en el control de la contaminación por metales:
nuevas metodologías de análisis y especiación metálica en
sistemas acuáticos. Estudios en la Bahía de Algeciras**

Memoria presentada por la Licenciada en Química
Dña. Margarita Isabel Díaz de Alba
para optar al grado de Doctor Europeo por la Universidad de Cádiz



Fdo.: Margarita I. Díaz de Alba

La presente Tesis Doctoral ha sido dirigida por las Doctoras Dña. M^a Dolores Galindo Riaño, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz y Dña. M^a Dolores Granado Castro, Profesora Contratada Doctor del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz, y cumple los requisitos exigidos por la legislación vigente.

Puerto Real a 24 de enero de 2013



Fdo.: M^a Dolores Galindo Riaño



Fdo.: M^a Dolores Granado Castro

Dr. D. DOMINICO GUILLÉN SÁNCHEZ, PROFESOR TITULAR DE
UNIVERSIDAD Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
ANALÍTICA DE LA UNIVERSIDAD DE CÁDIZ

CERTIFICA: Que el presente trabajo, realizado íntegramente en los laboratorios de este Departamento y en los de la Universidade do Algarve, bajo la dirección conjunta de los Profesores Dra. Dña. María Dolores Galindo Riaño y Dra. Dña. M^a Dolores Granado Castro, reúne las condiciones exigidas para optar al Grado de Doctor Europeo en Química.

Y para que conste, expido y firmo el presente certificado, en Puerto Real a 24 de enero de 2013.



Fdo: Dominico Guillén Sánchez

Los trabajos de investigación presentados en esta Tesis Doctoral han sido realizados gracias a la financiación recibida del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte a través de la concesión de la beca de investigación del programa de Formación de Profesorado Universitario, de duración 1/05/2007-30/04/2011, con referencia AP2006-03906. Además, parte de la investigación de esta Tesis (Capítulo 4) se engloba dentro del Proyecto de Investigación de Excelencia del Plan Andaluz de Investigación denominado "Evaluación del efecto de la contaminación por actividades antropogénicas crónicas sobre el medio litoral" (PAI 2006: P06-FQM-02075) concedido por la Junta de Andalucía. Asimismo, durante la estancia en la Universidade do Algarve (Portugal), bajo la dirección del profesor Dr. D. Jose Paulo Soares Pinheiro, se realizó un estudio sobre especiación metálica que se encuentra detallado en el Capítulo 3.

Los estudios descritos en la presente Memoria se encuentran recogidos en las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

Publicaciones

- M. Díaz-de Alba, M.D. Galindo-Riaño, M.J. Casanueva-Marengo, M. García-Vargas, C. M. Kosore, *Assessment of the metal pollution, potential toxicity and speciation of sediment from Algeciras Bay (South of Spain) using chemometric tools*, Journal of Hazardous Materials, 190 (2011) 177-187.
- M. Díaz-de Alba, M.D. Galindo-Riaño, M. García-Vargas, *Solid phase extraction of copper traces using poly(styrene-divinylbenzene) membrane disks modified with pyridoxal salicyloylhydrazone in water samples*, Talanta, 100 (2012) 432-438.
- M. Díaz-de Alba, M.D. Galindo-Riaño, M. García-Vargas, J.P. Pinheiro, *Lead electrochemical speciation analysis in seawater by using AGNES and SSCP techniques*. En preparación.
- M. Díaz-de Alba, M.D. Galindo-Riaño, M. García-Vargas, A. Taye, *Assessment of the metal pollution in Algeciras Bay: studies in water, sediment and fish*. En preparación.
- C.M. Kosore, M.D., Galindo-Riano, M. Díaz-de Alba, M. García-Vargas, *The Effects of Acetic Acid and DTPA on the Mobility of Sediment-Bound Heavy Metals in Algeciras Bay, Southern Spain*. En preparación.

Congresos

- M. Díaz-de Alba, M.D. Galindo-Riaño, M. García-Vargas, *Separation and preconcentration of Cu(II) traces by solid-phase extraction with modified SDB membrane disks using pyridoxal salicyloylhydrazone*, 2nd EuChemS Chemistry Congress, Turín (Italia), Septiembre 2008.
- A.I. Pérez Cordovés, M.D. Galindo-Riaño, M.J. Casanueva-Marengo, M. Díaz-de Alba, H. El Mai, F. Domínguez Lledó, M. García-Vargas, *Metodología y validación del análisis y la especiación de metales pesados en muestras de sedimentos acuáticos*, VII Congreso Internacional de Química e Ingeniería Química, La Habana (Cuba), Octubre 2009.
- M. Díaz-de Alba, M.D. Galindo-Riaño, J.J. Vicente-Martorell, M.J. Casanueva-Marengo, M. García-Vargas, A. Taye Assefa, *Assessment of bioaccumulation and bioavailability of Ni and Cr in fish species from Algeciras Bay (Spain)*, SETAC Europe Annual Meeting, Science and Technology for Environmental Protection, Sevilla (España), Mayo 2010.
- C. Mitto Kosore, M.D. Galindo-Riaño, M.J. Casanueva-Marengo, M. García-Vargas, M. Díaz-de Alba, *Assessment of the metal pollution, potential toxicity and speciation of sediment from Algeciras Bay (South of Spain) using chemometric tools*, VII Colloquium Chemiometricum Mediterraneum, Granada (España), Junio 2010.
- M. Díaz-de Alba, M.D. Galindo-Riaño, M. García-Vargas, *Metal speciation in seawater: links to bioaccumulation in fish tissues*, 2^{as} Jornadas de Electroquímica e Inovação, Faro (Portugal), Febrero 2011.
- M. Díaz-de Alba, M.D. Galindo-Riaño, M. García-Vargas, J.P. Pinheiro, *Lead speciation in seawater by AGNES and SSCP*, 2^{as} Jornadas de Electroquímica e Inovação, Faro (Portugal), Febrero 2011.

I promise myself...

To be strong that nothing can disturb my peace of mind.

To talk health, happiness, and prosperity to every person I meet.

To make all my friends feel that there is something worthwhile in them.

To look at the sunny side of everything and make my optimism come true.

To be just as enthusiastic about the success of others as I am about my own.

To think only of the best, to work only for the best, and to expect only the best.

To forget the mistakes of the past and press on to the greater achievements of the future.

*Christian D. Larson
The Optimist Creed*

Ha sido un largo camino recorrido lleno de esfuerzo y dedicación. Camino durante el cual he tenido la suerte de sentir el apoyo y colaboración de muchas personas, que tal vez ni siquiera sepan lo que han significado para mí en esta etapa de la vida. Por todo ello, es un verdadero placer utilizar este espacio para expresar mi más sincero agradecimiento a todas ellas.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directoras de Tesis, Dra. Dña. María Dolores Galindo Riaño y Dra. Dña. María Dolores Granado Castro, por haber confiado en mí desde un principio, por su gran dedicación, ayuda y orientación en este proyecto, así como su incansable espíritu de trabajo y, en especial, sus maravillosos consejos que me han impulsado a seguir adelante.

Por supuesto, un gran y sincero agradecimiento va dirigido al Profesor Dr. D. Manuel García Vargas, por su constante apoyo y confianza en mi formación investigadora en la Universidad de Cádiz desde los inicios de este trabajo.

A mis compañeros de Geoquímica Marina, Pilar, Carlos, Manuel Pedro, Carolina, Juan Pinto, Jose, Mostapha, Mirella, Vicky y Juanjo, que siempre han estado dispuestos a resolverme cuantas dudas he tenido; y a Clara, Estrella, Abdellah, Hafida y Bahija porque de compañeros pasaron a ser amigos, por ofrecerme su apoyo en esos días que todo parece salir del revés, y porque juntos hemos pasado buenísimos momentos tanto en el laboratorio como fuera del mismo.

A los colaboradores Adrián, Antonio, Nico, Pedro y Eva, por su ayuda brindada, así como por las risas que nos hemos echado en el laboratorio, a José María, Laura y al resto del Departamento de Química Analítica, por ser una fuente inagotable de amistad y compañerismo, y por hacer tan grata la convivencia.

A Cristina, María José, y Marta, por todas las palabras de ánimo que me han prestado, por todos los buenos y no tan buenos momentos que hemos vivido juntas desde que empezamos la carrera, y por estar siempre ahí, cuidándonos unas a otras.

No se me olvida la gente que he ido conociendo durante el transcurso de este trabajo, además de los que han estado desde siempre a mi alrededor mostrando su afecto y cariño y que de una forma u otra han aportado su granito de arena: Charles, Anteneh, Ana Isa, Joaquín, Luís, María del Mar, Khadija, Ilyas, María Jesús, Manu, Ana y Fran.

Asimismo, me gustaría expresar desde estas líneas un fuerte agradecimiento al Profesor D. José Paulo Soares Pinheiro por su acogida en la Universidade do Algarve y su dirección durante mi estancia allí. Ha sido un inmenso placer conocerle y haber tenido la oportunidad de aprender de él. En Faro conocí a gente estupenda, entre las que destacan Nataliya y Shubhanchi que fueron mi máximo apoyo y a las cuales les debo muchísimo por hacerme sentir como en casa, aun estando lejos de ella. Gracias por aquella experiencia inolvidable.

A Angel, que tuve la gran suerte de conocerlo antes del final de este camino, y que me brindó toda su confianza y apoyo incondicional. Por hacerme ver que el vaso siempre estará lleno y conseguir que todos los días me levante con una sonrisa. A él le debo mucho de lo que soy ahora y de cómo seremos en un futuro. Gracias por aguantarme, escucharme y amarme.

Y por último, pero no por ello menos importante, deseo expresar mis más profundo agradecimiento a mi familia: a mis abuelos, aunque algunos estén un poquito más lejos, a mis padres, por su intenso apoyo y cariño, por aguantar mis nervios y agobios, y por supuesto, por dedicarme siempre unas palabras de aliento que mantenían mi ilusión por seguir avanzando en el mundo de la investigación; y a mi hermana y a Roby por estar siempre cuando los he necesitado y sonsacarme miles de sonrisas.

A todos y cada uno de vosotros, *¡GRACIAS!*

*A mi familia,
por ser fuente de inspiración para mi superación*

Índice

<i>Objetivos</i>	1
 <i>Capítulo 1. Introducción: Metales pesados en el medio ambiente</i>	7
1.1. El agua y su contaminación por metales pesados	7
1.2. Fuentes de contaminación por metales pesados	23
1.3. Distribución de metales pesados en ecosistemas acuáticos	27
1.3.1. Sumideros de metales en ecosistemas acuáticos	31
1.4. Especiación de metales en ecosistemas acuáticos	34
1.4.1. Especiación de metales en aguas	38
1.4.2. Especiación de metales en sedimentos	40
1.5. Legislación ambiental	44
 <i>Capítulo 2. Análisis por extracción en fase sólida del contenido de cobre en aguas naturales</i>	55
2.1. El cobre en la naturaleza	56
2.2. Extracción en fase sólida aplicada al análisis de metales pesados en aguas .	58
2.2.1. Fundamento de la SPE	60
2.2.2. Tipos de formato	60
2.2.3. Tipos de adsorbentes y selección adecuada de discos	63
2.3. Determinación de metales pesados en aguas naturales por extracción en fase sólida SPE.....	69
2.4. Aplicabilidad de las hidrazonas en extracción en fase sólida con discos de membrana	74

2.5. Un nuevo método de análisis de Cu(II) por extracción en fase sólida	76
2.5.1. Estudios previos para la elección del reactivo orgánico para SPE	77
2.5.2. Piridoxal Saliciloilhidrazona	82
2.5.2.1 Estabilidad de la disolución metanólica de PSH	85
2.5.3. Estequiometría del complejo Cu-PSH	85
2.5.3.1. Método de la razón molar	87
2.5.3.2. Método de las variaciones continuas	90
2.5.4. Constante de formación del complejo Cu(II)-PSH	92
2.5.5. Equipos y metodología de análisis de Cu(II) utilizando extracción en fase sólida	95
2.5.5.1. Equipos utilizados	95
2.5.5.2. Metodología de análisis de Cu(II) utilizando extracción en fase sólida	96
2.5.6. Optimización de la metodología de análisis de Cu(II) por SPE mediante el empleo de PSH	99
2.5.6.1. Estudio de la influencia de la naturaleza del eluyente	101
2.5.6.2. Estudio del volumen de eluyente en la recuperación del metal	104
2.5.6.3. Estudio de la influencia del pH de la muestra sobre la eficacia de la SPE	105
2.5.6.4. Estudio de la influencia de la cantidad de reactivo inmovilizado en el disco de membrana SDB	106
2.5.6.5. Estudio de la influencia de la velocidad de flujo de la muestra y del eluyente durante el proceso de preconcentración del metal.....	107
2.5.6.6. Optimización de las variables más significativas: Diseño de experimento factorial fraccionario 3^{3-1}	108
2.5.7. Características analíticas del método propuesto para la extracción en fase sólida de iones Cu(II) en aguas naturales	113
2.5.7.1. Reutilización y capacidad máxima del disco	113
2.5.7.2. Volumen máximo de muestra	114
2.5.7.3. Curva de calibrado	115
2.5.7.4. Límite de detección y cuantificación	116
2.5.7.5. Reproducibilidad del método	116

2.5.7.6. Interferencias del método de separación y preconcentración de Cu(II) por SPE con discos modificados con PSH	119
2.5.7.6.1. Efecto de los iones mayoritarios y minoritarios presentes en agua de mar	119
2.5.7.6.2. Efecto de la presencia de iones de metales pesados presentes en agua de mar	121
2.5.8. Validación del método de extracción en fase sólida	123
2.5.9. Comparación del método propuesto con otros descritos en la bibliografía	126
2.6. Conclusiones	129
 <i>Capítulo 3. Estudio de especiación de plomo en agua de mar mediante AGNES y SSCP</i>	
3.1. El plomo en la naturaleza	133
3.2. Técnicas electroanalíticas aplicadas al análisis y especiación de metales pesados	137
3.2.1. Voltamperometría de redisolución	140
3.2.2. Cronopotenciometría de redisolución de barrido (SSCP)	146
3.2.3. Redisolución en ausencia de gradiente y en equilibrio Nernstiano (AGNES)	148
3.3. Fundamentos teóricos de las técnicas SCP y SSCP	151
3.3.1. Fundamentos de la Cronopotenciometría de Redisolución (SCP)	151
3.3.2. Fundamentos de la Cronopotenciometría de Redisolución de Barrido .	159
3.3.2.1. Expresión para la curva SSCP en el caso de una muestra que solo contenga metal	160
3.3.2.2. Expresión para la curva SSCP en el caso de que existan ligandos en la muestra	162
3.4. Fundamentos teóricos de la técnica AGNES	174
3.5. Material y metodología de análisis de Pb en agua de mar utilizando AGNES y SSCP	182
3.5.1. Disoluciones y equipos utilizados	182
3.5.2. Metodología de análisis de Pb en agua de mar utilizando AGNES y SSCP	184
3.5.2.1. Metodología para el análisis del carbono orgánico	185
3.5.2.2. Experimentos de AGNES-SSCP	186
3.5.2.2.1. Metodología para AGNES	186

3.5.2.2.2. Metodología para SSCP	192
3.6. Resultados del análisis de especiación de Pb en agua de mar sintética y real	202
3.6.1. AGNES	202
3.6.1.1. Determinación de E_{peak} a partir de una medida de DPP para obtener el potencial de deposición E_1 que se aplicará en AGNES	202
3.6.1.2. Evaluación del parámetro h mediante calibración de una disolución de metal sin ligando	203
3.6.1.3. Aplicación de AGNES a las muestras de estudio	204
3.6.2. SCP y SSCP	211
3.6.2.1. Repetibilidad de la señal analítica τ en SCP	211
3.6.2.2. Reproducibilidad de las curvas SSCP	212
3.6.2.3. Aplicación de SSCP a muestras sintéticas de agua de mar	213
3.6.2.4. Aplicación de SSCP a muestras reales de agua de mar	217
3.6.3. Comparación entre AGNES y SSCP	220
3.7. Conclusiones	221
<i>Capítulo 4. Evaluación de la contaminación metálica en la Bahía de Algeciras</i>	225
4.1. Antecedentes y descripción de la zona de estudio	226
4.1.1. Clasificación de las aguas de la Bahía de Algeciras	229
4.1.2. Estudios previos de contaminación metálica en la Bahía de Algeciras	230
4.2. Metales estudiados en la Bahía de Algeciras	232
4.2.1. Arsénico	232
4.2.2. Níquel	235
4.2.3. Cobalto	236
4.2.4. Cromo	238
4.3. Toma de muestra	240
4.3.1. Muestras de agua	242
4.3.2. Muestras de sedimento	243
4.3.3. Muestras de peces	244
4.4. Protocolos de limpieza	245
4.4.1. Procedimiento general de limpieza de material	246

4.4.2. Procedimiento de limpieza en la toma de muestra de aguas	247
4.5. Equipos y metodología	249
4.5.1. Equipos utilizados	249
4.5.2. Metodología	250
4.5.2.1. Análisis de parámetros generales	250
4.5.2.2. Especiación de As en aguas	251
4.5.2.3. Especiación de Ni y Co en aguas	253
4.5.2.4. Especiación de Cr en aguas	255
4.5.2.5. Análisis del contenido total de metales en sedimentos	259
4.5.2.6. Especiación de metales en sedimentos	260
4.5.2.7. Análisis del contenido total de metales en muestras biológicas	264
4.5.2.8. Tratamiento estadístico de los datos	266
4.6. Análisis de blancos, límite de detección y validación de las técnicas empleadas	267
4.6.1. Ni, Co y Cr en aguas por DPAdCSV	267
4.6.2. As en aguas por HGAAS	269
4.6.3. As, Ni, Co y Cr en sedimentos	270
4.6.3.1. Contenido total de metales en sedimentos	270
4.6.3.2. Especiación de metales en sedimentos	271
4.6.4. As, Ni, Co y Cr en muestras biológicas	273
4.7. Estudios previos y selección de los puntos de muestreo	275
4.8. Estudio de los parámetros físico-químicos en la Bahía de Algeciras	284
4.8.1. Parámetros medidos <i>in situ</i>	285
4.8.2. Parámetros generales	292
4.9. Distribución y biodisponibilidad de As, Ni, Co y Cr en la Bahía de Algeciras	297
4.9.1. Contenido metálico en agua	298
4.9.1.1. Concentración total en agua	298
4.9.1.2. Distribución metálica entre la fase disuelta y particulada	303
4.9.1.3. Especiación metálica en aguas	310
4.9.2. Contenido metálico en sedimentos	319
4.9.2.1. Concentración total en sedimentos	320

4.9.2.2. Especiación metálica en sedimentos	323
4.9.3. Contenido metálico en muestras biológicas	330
4.10. Comparación del contenido metálico	343
4.10.1. Comparación entre los puntos de muestreo	343
4.10.2. Comparación con valores de referencia	359
4.10.2.1. Comparación con valores de referencia en las muestras de agua	359
4.10.2.2. Comparación con valores de referencia en las muestras de sedimentos	363
4.10.2.3. Comparación con valores de referencia en las muestras de peces	368
4.11. Conclusiones	368
<i>Conclusiones generales</i>	371
<i>Anexos</i>	375
<i>Referencias</i>	411
<i>English Summary</i>	445
<i>Artículos derivados de la Tesis</i>	523

Objetivos

La importancia de monitorizar y evaluar la contaminación metálica en muestras acuáticas es incuestionable dado el efecto nocivo que supone su presencia a determinadas concentraciones sobre la calidad medioambiental y sobre los organismos vivos. De igual forma, la capacidad de algunos metales pesados de presentar el fenómeno de la biomagnificación o bioacumulación, los convierten en sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas en la que se incluyen de forma explícita estos elementos así como algunos de sus compuestos (*Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008*, publicada en el DOUE núm. L348/84, de 24 de diciembre de 2008).

La directiva Marco de Aguas de la Unión Europea (*Directiva 2000/60/CE, de 23 de octubre de 2000*, publicada en el DOCE núm. L327/1, de 22 de diciembre de 2000) establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas por medio de una estrategia combinada que comporta la formulación de normas armonizadas de calidad del agua y el monitoreo o control de emisiones a escala europea. El éxito de la implementación de esta normativa marco dependerá de la disponibilidad de herramientas analíticas de bajo coste y de la tecnología capaz de producir resultados de calidad.

El enfoque principal de esta tesis doctoral se centra en el estudio de nuevos avances químico-analíticos aplicados al control de la contaminación por metales pesados, principalmente en ecosistemas acuáticos. Para ello, se tendrá en cuenta el concepto de especiación metálica, que define adecuadamente las especies potencialmente más peligrosas y con mayor disponibilidad para los seres vivos.

Estos estudios se abordan tanto desde el punto de vista de investigación básica, con el desarrollo de nuevas metodologías de análisis de metales pesados, como desde un punto de vista de investigación aplicada mediante el estudio de la contaminación metálica de origen antropogénico en aguas costeras andaluzas.

Para cada uno de estos aspectos se plantean diversos objetivos específicos:

1. Desarrollo y aplicación de nuevas metodologías de análisis de metales pesados en muestras medioambientales con matriz compleja, como puede ser el agua de mar. En este apartado se incluyen los siguientes estudios:

- Desarrollo de una nueva metodología de preconcentración mediante extracción en fase sólida, utilizando discos de membrana previamente modificados con un ligando orgánico quelatante. Esta técnica cuenta con la ventaja de que aísla el analito y elimina la posible interferencia de la matriz en muestras con propiedades desfavorables para el análisis directo, siendo novedoso su uso en la preconcentración de trazas metálicas en muestras de aguas naturales.
- Estudio de la aplicabilidad de las técnicas de Redisolución en Ausencia de Gradiente y en Equilibrio Nernstiano (AGNES), así como de la Cronopotenciometría de Redisolución de Barrido (SSCP) para evaluar la especiación de metales pesados en agua de mar.

2. Estudios de impacto medioambiental en aguas afectadas por una intensa actividad antropogénica, mediante la evaluación de los niveles metálicos totales y su especiación química. La zona seleccionada de estudio es la Bahía de Algeciras, caracterizada por un impacto crónico persistente. En su entorno, existen industrias que de forma directa o indirecta emplean diversos metales pesados, considerados, entre otros, como contaminantes prioritarios. Estos contaminantes pueden llegar al medio ambiente que rodea la zona y en concreto a los sistemas acuáticos próximos. Por ello, se pretende realizar un estudio integrado de impacto de esta actividad sobre la Bahía de Algeciras, para lo que se propone la evaluación del nivel de contaminación de algunos metales en las aguas, los sedimentos y la biota. Estos tres compartimentos ambientales son los referenciados en las estrategias de trabajo de la Directiva Marco de Aguas para la monitorización de las aguas marinas. En concreto se proponen los siguientes estudios:

- Establecer los niveles totales de metales (As, Cr, Ni y Co, metales muy significativos de la industria siderúrgica y petroquímica) presentes en las aguas y los sedimentos, así como evaluar su distribución en las distintas fracciones químicas (especiación) en ambos compartimentos medioambientales.
- Cuantificar los niveles de concentración de metales en tejidos de hígado, músculo y branquias en peces de interés comercial para estudiar el efecto que la contaminación química ejerce sobre estas especies (especies biomonitoras de contaminantes inorgánicos).
- Correlacionar los niveles metálicos en el medio biótico con el medio abiótico, identificando las formas químicas más biodisponibles, y en consecuencia con mayor potencial tóxico, para los metales estudiados.

Capítulo 1

Introducción: Metales pesados en el medio ambiente

1

Introducción: Metales pesados en el medio ambiente

1.1. El agua y su contaminación por metales pesados

El agua es un recurso vital para la alimentación, higiene y actividades del ser humano, así como para la agricultura y la industria. Desde la antigüedad el hombre ha establecido sus poblaciones en zonas próximas a los cursos de agua, no sólo porque ésta es imprescindible para la vida, sino porque es útil para muchas de las actividades que desarrolla. Debido a ello, los ríos han sido con frecuencia los receptores de muchos de los residuos generados por el hombre.

El crecimiento de la industria, de la urbanización y de la población humana, junto con el uso creciente de abonos y plaguicidas en agricultura influyen notablemente en el deterioro de la calidad de las aguas naturales y acrecienta los problemas de contaminación y en consecuencia, dificultan el suministro de agua potable.

Para poder adoptar soluciones, es necesario conocer las posibles causas y fuentes de contaminación del medio hídrico. Pero en primer lugar, habría que definir el concepto de *contaminación*. A pesar de que se trata de un concepto sujeto a revisión permanente por parte de la comunidad científica, la mayoría de autores coinciden en definir la contaminación del agua como la acción y el efecto de introducir materias o formas de energía, o inducir condiciones en el agua que, de modo directo o indirecto impliquen una

alteración perjudicial de su calidad en relación con los usos posteriores, con la salud humana, o con los ecosistemas acuáticos o terrestres directamente asociados a los acuáticos; causen daños a los bienes; y deterioren o dificulten el disfrute y los usos del medio ambiente (*Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de Julio*, BOE núm. 176, de 24 de julio de 2001). También se ha descrito recientemente el término *polutante* como cualquier sustancia o efecto que altera adversamente el ecosistema acuático produciendo un cambio en la tasa de crecimiento de especies, interfiere en la cadena alimentaria, es tóxico o interfiere en la salud, bienestar, comodidades o en los valores de propiedad de la población [Porteous, 2008; vanLoon y Duffy, 2011]. Aunque los conceptos de contaminante y polutante han sido ampliamente utilizados como sinónimos, existen ciertos autores que los diferencian, de manera que definen un *contaminante* como una sustancia presente en la naturaleza en una concentración por encima de su nivel de fondo, independientemente de que cause o no efectos adversos; mientras que un *polutante* es un contaminante que causa efectos adversos [Chapman, 2007; Porteous, 2008]. Según estas definiciones, todos los polutantes son contaminantes pero no todos los contaminantes se consideran polutantes, puesto que las sustancias introducidas en la naturaleza pueden ser más o menos biodisponibles para los organismos dependiendo de su forma química, de factores intrínsecos al medio, del compartimento en el que se encuentran y de las reacciones tanto fisiológicas como conductuales de la biota expuesta [Chapman, 2007].

Existen diferentes categorías de contaminación, entre las que se incluyen la contaminación química, la física, la radioactiva, la biológica y la estética. La presente Tesis Doctoral está centrada principalmente en los contaminantes químicos y su determinación en matrices medioambientales.

La mayoría de las sustancias que se consideran contaminantes son, de hecho, constituyentes naturales de la naturaleza, si bien es cierto que se encuentran en concentraciones que por lo general no son nocivas. Es el incremento en la concentración de estos constituyentes naturales, por lo general debido a actividades industriales, lo que resulta preocupante. No obstante, existen algunos contaminantes que son enteramente sintéticos y que no se encontrarían en la naturaleza de no ser por actividades humanas (como por ejemplo, los clorofluorocarbonos, CFCs) [Radojevic y Bashkin, 2006].

La contaminación acuática puede ser puntual (en el caso de que se produzca por un foco emisor determinado e identificable afectando a una zona concreta) o difusa (cuando el origen no está claramente definido y se ven afectadas zonas amplias en las que coexisten múltiples focos de emisión). En sentido general, se pueden considerar como principales fuentes de contaminación del medio hídrico, las aguas residuales urbanas, las industriales, las agrícolas y ganaderas, y la atmósfera.

Asimismo, los contaminantes básicos que se encuentran en la hidrosfera pueden clasificarse en 5 grupos (Tabla 1.1): radioactividad, contaminantes orgánicos, metales pesados, ácidos y nutrientes.

Tabla 1.1. Contaminantes presentes en la hidrosfera [Radojevic y Bashkin, 2006]

Contaminante	Origen de la contaminación	Características
Radioactividad	Descargas accidentales de industrias nucleares, transporte de material nuclear y pruebas nucleares	Los efectos sobre la salud humana son materia de debate
Contaminantes Orgánicos	Uso de herbicidas y pesticidas en agricultura. Contaminación marina por accidentes de tanques que contienen petróleo	Una gran cantidad de compuestos químicos orgánicos se descargan con frecuencia, como pesticidas, hidrocarburos, detergentes, etc. Son potencialmente dañinos para los ecosistemas acuáticos y la salud humana
Metales Pesados	Agricultura, drenajes urbanos y domésticos, así como desechos de industrias y minerías	Gran cantidad de metales pesados pueden producir efectos tóxicos en la salud humana y en los ecosistemas acuáticos (ej. plomo, mercurio, cadmio)
Ácidos	Drenaje de minas, desechos de industrias y deposición ácida desde la atmósfera	Pueden dañar los ecosistemas acuáticos por producir movilización de metales tóxicos (ej. ácido sulfúrico, ácido nítrico)
Nutrientes	Uso de fertilizantes en la agricultura. Presencia en las aguas residuales	Pueden causar eutrofización (ej. fósforo y nitrógeno). Los nitratos pueden afectar a la salud humana

Especial atención se debe prestar al grupo de contaminantes formados por los metales pesados, que son aquellos elementos químicos que presentan una densidad superior a 5 g/cm³ [Berkowitz y col., 2008]. Prácticamente todos los metales de transición pueden considerarse metales pesados. Excepciones a esta definición son el titanio, que se considera metal pesado aun teniendo una densidad inferior (4,5 g/cm³), y el arsénico, que a pesar de ser considerado como metaloide, por su elevada densidad (5,7 g/cm³) y por algunas propiedades de carácter ambiental se suele clasificar también como metal pesado [Domènech y Peral, 2006].

Los metales pesados presentan cinco aspectos fundamentales que los caracterizan y los diferencian de otros elementos y compuestos químicos [Fairbrother y col., 2007]:

1. Son constituyentes naturales del medio ambiente y su concentración varía según el área geográfica donde se encuentren.
2. Todos los ecosistemas contienen mezclas naturales de metales y éstos entran a menudo en la naturaleza en forma de mezclas, con lo que se debe prestar especial atención a los efectos sinérgicos, antagónicos o aditivos que pueden presentar.
3. Algunos metales son esenciales para la salud humana, de animales, plantas y microorganismos. Tanto si existen deficiencias como excesos de estos metales esenciales en organismos, se pueden producir efectos adversos nutricionales.
4. La química de los metales influye notablemente en su destino y en los efectos que pueden causar en humanos y demás receptores ecológicos. A diferencia de los contaminantes orgánicos, los metales no se crean ni se destruyen mediante procesos químicos o biológicos. Sin embargo, estos procesos pueden transformar los metales, bien modificando su estado de oxidación, o convirtiéndolos en compuestos o derivados orgánicos o inorgánicos.
5. La toxicocinética y la toxicodinámica de los metales dependen del metal, de la forma del metal o del compuesto metálico y la capacidad del organismo de regular y/o acumular el metal. Son contaminantes biodisponibles para los organismos vivos, se bioacumulan en éstos y pueden sufrir procesos de biomagnificación a través de la cadena trófica.

Para la mayoría de los organismos la exposición a metales pesados, por encima de una concentración umbral puede ser extremadamente tóxica. Los de mayor importancia toxicológica y ecotoxicológica son: Hg, As, Cr, Pb, Cd, Ni y Zn [Castañé y col., 2003].

Los metales pueden ser liberados al medio ambiente en cantidades suficientes como para constituir un riesgo para la salud humana. Estos elementos se enlazan fácilmente con el material particulado o sedimentos, y de esta forma son relativamente menos tóxicos, pero cambios en el tiempo o en las condiciones del medio u otros factores medioambientales pueden provocar la movilización de los mismos, aumentando su disponibilidad y toxicidad [Berkowitz y col., 2008; Namiesnik y Szefer, 2010].

Debido a su alto grado de persistencia en el medio, su tendencia a la bioacumulación en la cadena trófica y, en ciertos casos, a su elevada toxicidad incluso a bajas concentraciones, los metales pesados son considerados uno de los grupos de contaminantes ambientales más peligrosos y por lo tanto, constituyen un riesgo importante para los seres vivos.

Respecto a la potencial toxicidad de los metales pesados, hay que tener presente que su comportamiento frente a los organismos vivos puede describirse de diversas maneras. Así, en este sentido, se emplean frecuentemente ciertos términos que permiten describir la

conducta de los contaminantes en relación con los sistemas biológicos acuáticos: bioacumulación, biomagnificación, bioconcentración y biodisponibilidad. Estos términos se definen como [Nordberg y col., 2009]:

- Bioacumulación: Aumento progresivo de la cantidad de sustancia en un organismo o parte de él, como consecuencia de que la velocidad de absorción supera la capacidad del organismo para eliminar la sustancia.
- Biomagnificación: Secuencia de procesos por los cuales la concentración de una sustancia se ve incrementada en los organismos situados en niveles superiores de la cadena trófica con respecto a aquellos organismos que se encuentran en niveles inferiores.
- Bioconcentración: Proceso por el cual la concentración de una sustancia en un organismo aumenta con respecto a la que tiene en el ambiente al que está expuesto.
- Biodisponibilidad: Grado de absorción de una sustancia por un organismo vivo, normalmente expresada como una fracción de la cantidad total de la sustancia disponible en el ambiente al que está expuesto.

La *bioacumulación* hace referencia al balance entre la cantidad de metal incorporado a los seres vivos y la cantidad que éstos son capaces de eliminar de su propio organismo. Como consecuencia de dicho balance se puede producir un aumento o una disminución neta del contenido metálico en el organismo. Este término tiene en cuenta el hecho de que aunque la dosis puntual de metales pesados esté por debajo de valores que puedan producir efectos adversos sobre los organismos, sin embargo, la continua acumulación en situaciones en las que el balance metálico ingreso/excreción sea positivo puede hacer que los niveles de los metales pesados en el organismo se incrementen con el tiempo hasta valores en los que se manifiesten efectos adversos. De forma genérica, la bioacumulación de metales pesados en organismos acuáticos aumenta bajo determinadas circunstancias, entre las que destacan el menor peso corporal (estadios larvarios y juveniles), menor salinidad, mayor temperatura del agua, ausencia de metales competidores (mayor bioacumulación en aguas de baja dureza) y mayor proximidad a la superficie del agua [Crompton, 2007]. Puesto que las concentraciones de metales pesados en las zonas costeras, bahías y estuarios son notablemente mayores a las que se encuentran en aguas oceánicas, el riesgo es consecuentemente mayor. Aunque las concentraciones de metales pesados en la mayoría de los sistemas costeros y de estuario suelen encontrarse por debajo de niveles en los que se han comprobado sus efectos tóxicos y letales sobre los organismos acuáticos, en ensayos de laboratorio se han encontrado indicios de efectos a medio-largo plazo de metales pesados sobre los organismos vivos a concentraciones subletales debido, principalmente, a fenómenos de bioacumulación.

La *biomagnificación* se produce por el incremento en la concentración de un contaminante en los organismos a medida que asciende en su posición en la cadena trófica. Así, la cantidad de metal retenida por un organismo es asimilada directamente por su depredador, que a su vez puede servir de alimento a otro organismo situado en un nivel superior de la cadena trófica, con el consiguiente incremento en la cantidad de metal acumulado por este último. Es difícil documentar los posibles casos de biomagnificación debido a los inconvenientes que se tienen para disponer de todos los organismos que componen la dieta del predador en la cadena trófica de un ecosistema en particular, y además es difícil correlacionar diferentes especies situadas a distintos niveles con un sistema idéntico de captación del contaminante, una distinta exposición (longevidad) y diferente fisiología (desintoxicación).

El término *bioconcentración* tiene en consideración la relación existente entre la incorporación de metales al organismo vivo y el medio abiótico en el que habita; este parámetro es más fácil de determinar que el de bioacumulación. El grado en el cual un metal se concentra en un organismo acuático viene dado por el factor de enriquecimiento (FE), que se define como el cociente entre la concentración de metal en el material biogénico y la concentración del metal en el agua o sedimento [Campbell y col., 2002]. Es de destacar que tanto el fitoplancton como el zooplancton, base fundamental de la cadena trófica en los sistemas acuáticos, presentan unos factores de enriquecimiento notables para ciertos elementos. Otros organismos que sobresalen son los moluscos por sus altos niveles de bioconcentración; los peces también concentran metales, aunque con factores de enriquecimiento notablemente menores a los anteriores organismos [Kennish, 1996]. Así, cada vez cobra más importancia la evaluación de la concentración de metales pesados en organismos acuáticos a través del análisis químico del contenido metálico en sus tejidos, con la doble intención de investigar la distribución y comportamiento de los metales en relación con la biota acuática, además de preservar tanto las especies animales como la salud humana, puesto que muchos de estos organismos sirven de alimento al hombre.

Se define *biodisponibilidad* como la afinidad de un contaminante para ser absorbido o adsorbido por un organismo vivo, atravesando las barreras biológicas (membranas celulares o epitelios compuestos por una doble membrana lipídica con moléculas proteicas y canales cargados electroquímicamente), mediante procesos biológicos activos o procesos pasivos de tipo físico o químico. No obstante, algunos científicos diferencian entre disponibilidad externa o "bioaccesibilidad" y "biodisponibilidad interna" [Caussy y col., 2003; Peijnenburg y Jager, 2003], considerándose una sustancia bioaccesible aquella que puede entrar en contacto con el organismo y ser absorbidas, y las sustancias biodisponibles, aquellas que tras ser absorbidas por el organismo pueden interactuar con las moléculas u órganos diana. Factores fisicoquímicos como la temperatura, la salinidad, la presencia o ausencia de agentes complejantes, la presencia o ausencia de otros metales y

factores propios de los organismos, como el grado de impermeabilidad superficial o la etapa nutricional, entre otros, determinan la biodisponibilidad de los metales hacia los organismos. En cualquier caso, la biodisponibilidad de los metales va a estar íntimamente ligada y va a depender de su especiación química.

Los elementos metálicos están presentes en aguas naturales a muy baja concentración, a niveles inferiores a 1 mg/L, y por ello se incluyen dentro del grupo conocido como elementos traza, los cuales, a pesar de sus bajos niveles de concentración, poseen importantes implicaciones a nivel químico y biológico en los sistemas acuáticos naturales. En las últimas décadas la escala de componentes a nivel de traza se ha subdividido en trazas y ultratrazas, denominándose estos últimos como analitos cuya concentración se encuentra por debajo de 1 µg/L. El concepto de *traza* en Química Analítica ha ido evolucionando con los años, a medida que las técnicas y metodologías de análisis han permitido detectar y cuantificar niveles de concentración cada vez menores. La Tabla 1.2 muestra la evolución cronológica del término *traza* como sinónimo de baja concentración de un determinado compuesto [Cámara y Pérez-Conde, 2011]:

Tabla 1.2. Evolución cronológica del término "traza" [Cámara y Pérez-Conde, 2011]

Año	Descripción	Concentración
1900	Traza	<0,1-0,2% (1000 mg/L)
1940	Macroconstituyente	>1%
	Microconstituyente	0,01-1%
	Traza	<0,01% (<100 mg/L)
1970	Traza	<100 mg/L
	Ultratraza	<1 mg/L
1980-2009	Ultratraza	1 µg/L

En la Tabla 1.3 se resumen los elementos traza más importantes presentes en las aguas naturales. Algunos de estos metales trazas pueden ser clasificados como elementos esenciales, ya que suelen ser componentes de sistemas enzimáticos, los cuales catalizan reacciones bioquímicas importantes como son glicólisis, fotosíntesis, formación de proteínas y metabolismo. A pesar de ser esenciales, hay que tener en cuenta que pueden resultar tóxicos a niveles más altos. Esta característica es común para muchas sustancias en el ambiente acuático, y debe tenerse presente al juzgar la importancia ambiental y toxicológica de un elemento particular.

Tabla 1.3. Elementos traza importantes en las aguas naturales [Orozco-Barrenetxea, 2008; <http://www.epa.gov/safewater/contaminants/index.html>]

Elemento	Fuentes	Efectos e importancia
Antimonio	Descargas de petróleos de refinerías, retardantes ignífugos, soldaduras, electrónica, esmaltes, tipografía	Tóxico, aumenta el colesterol en sangre y disminuye el azúcar en sangre
Arsénico	Medio geológico, pesticidas, residuos químicos y subproductos mineros	Tóxico, carcinogénico. Daños en la piel y en el sistema nervioso
Bario	Medio geológico, efluentes de refinerías, pinturas	Tóxico. Aumenta la presión arterial
Berilio	Carbón, industria nuclear y espacial	Tóxico. Daño en pulmones
Cadmio	Medio geológico, tuberías, minería, electrodeposición	Tóxico. Causa elevada presión en la sangre, problemas renales, destruye el tejido testicular. Acumulativo en hígado, riñón y páncreas
Cobalto	Medio geológico, minería, pinturas, tintes, metalurgia	Esencial, forma parte de la vitamina B-12. Tóxico para plantas a pH ácido
Cobre	Medio geológico, recubrimientos metálicos, residuos industriales, electrodeposición, minería	Esencial, tóxico para plantas y algas a niveles altos. Daños en el sistema digestivo
Cromo	Recubrimientos metálicos, curtido, efluentes de fábricas de acero y papel	Esencial como Cr(III), tóxico como Cr(VI). Daños al sistema digestivo, riñón e hígado
Hierro	Medio geológico, corrosión, residuos industriales, aguas ácidas de minas, acción microbiana	Nutriente esencial, su deficiencia provoca anemia
Manganeso	Medio geológico, drenajes, residuos industriales, aguas ácidas de mina, acción microbiana	Elemento esencial, presenta baja toxicidad para animales. A altas concentraciones, produce daños en el sistema nervioso
Mercurio	Medio geológico, minería, carbón y residuos industriales	Toxicidad tanto aguda como crónica, especialmente como organometal
Molibdeno	Fuentes naturales, residuos de industrias	Esencial para plantas, tóxico para animales en altas concentraciones
Níquel	Pigmentos, baterías, recubrimiento de metales, aleaciones, catalizadores	Cancerígeno en altas dosis, produce dermatitis y náuseas
Plomo	Medio geológico, combustibles, minería, residuos industriales	Tóxico, acumulativo. Afecta a los riñones y al sistema nervioso. Produce inhibición de la síntesis de la hemoglobina
Selenio	Fuentes naturales, carbón, tintes, aleaciones, catalizador, pinturas	Esencial a bajos niveles, tóxico a niveles superiores. Causa hemorragias
Cinc	Residuos industriales, recubrimientos de metales, pigmentos, pinturas	Elemento esencial. Tóxico para las plantas a altos niveles

De esta manera, los metales pesados pueden clasificarse en dos grupos: el primero engloba a los denominados esenciales u oligoelementos, que son aquellos elementos que resultan necesarios para que los organismos vivos completen su ciclo vital, siendo requeridos en cantidades pequeñas, aunque pasado un cierto umbral, pueden ser tóxicos (como Zn, Cu, Co, Se, Mo, Fe, Mn y el estado de oxidación III del Cr). Se dice que un metal es esencial cuando su ausencia puede llegar a afectar a determinados procesos biológicos, haciendo que no se desarrollen de manera correcta y provocando en situaciones límite daños importantes en los organismos, incluso la muerte. No obstante, cuando la concentración de estos metales supera el aporte nutricional pueden conllevar efectos tóxicos e incluso letales. El segundo grupo está constituido por aquellos metales pesados que no presentan una función biológica o metabólica conocida y son tóxicos a dosis mínimas (como por ejemplo Pb, Hg, Cd, As y el estado de oxidación VI del Cr).

Cuando se superan los niveles máximos permitidos, todos los metales, tanto esenciales como no esenciales, pueden afectar al metabolismo normal de un organismo, bien porque se unan a biomoléculas no específicas o porque provoquen daños oxidativos debido a su capacidad para catalizar reacciones redox. Esto puede acarrear una desactivación de reacciones enzimáticas esenciales, dañar las estructuras celulares y modificar el ADN (mutagénesis). En humanos, exposiciones cortas a altos niveles de metales pueden causar síntomas de toxicidad aguda, mientras que exposiciones largas de ciertos metales a niveles más bajos pueden provocar alergias o acabar incluso en cáncer [Berkowitz y col., 2008].

La toxicidad de los metales pesados sobre los organismos vivos depende no sólo de la concentración en la que se encuentren presentes, sino también de otros factores tanto bióticos o intrínsecos a la naturaleza del propio organismo (familia y especie a la que pertenece, mecanismos de regulación de metales, edad, estrés, etc.) como abióticos o relacionados con las características del hábitat, el tiempo al que hayan estado expuestos al metal (efectos agudos o crónicos) y el grado de accesibilidad de éstos por parte de los organismos vivos.

Normalmente, la toxicidad de un metal en organismos acuáticos, como peces, invertebrados, algas o bacterias se evalúa mediante ensayos de toxicidad, en los cuales dichos organismos se someten a una exposición, bajo condiciones estándares, a distintas concentraciones de metales durante un cierto período de tiempo, transcurrido el cual se comprueba el efecto producido sobre los organismos. Estos ensayos son la fuente de información predominante para la evaluación ecológica de los efectos de los contaminantes tóxicos. Con ellos, se consigue establecer los límites permitidos para los distintos contaminantes, evaluar el impacto de mezclas sobre las comunidades de los ambientes que las reciben, así como comparar la sensibilidad de una o más especies a distintos tóxicos o a diferentes condiciones para el mismo tóxico [Crompton, 2007].

En las Tablas 1.4 y 1.5 se recogen las concentraciones en agua de algunos metales por encima de las cuales diversos organismos acuáticos adultos no sobreviven a una exposición aguda de corta duración, en condiciones de agua dulce y salada, respectivamente. Como se aprecia, los niveles dependen del metal de que se trate, el tipo de organismo y las condiciones de salinidad, entre otros factores. Entre los organismos más sensibles se encuentran los moluscos bivalvos, ya que estos organismos filtran el agua, lo que facilita la retención de metales, tales como cobre y cadmio.

Tabla 1.4. Concentración de metales ($\mu\text{g/L}$) que causan mortalidad en organismos adultos, para una exposición de corta duración (4-14 días) en agua dulce [Crompton, 2007]

Organismo	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
Anélidos	-	>100	-	>100	>100	>1000	>10000	>1000
Moluscos bivalvos	-	-	-	>10	-	-	-	-
Crustáceos	>100	>0,1	-	>1	>0,1	>10	>10	>10
Gasterópodos	-	-	-	>10	-	>10000	>10	-
Peces	>100	>10	>1000	>100	-	>100	>10	>1000

Tabla 1.5. Concentración de metales ($\mu\text{g/L}$) que causan mortalidad en organismos adultos, para una exposición de corta duración (4-14 días) en agua de mar [Crompton, 2007]

Organismo	As	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
Anélidos	-	>1000	-	>10	>100	>10000	>100	>1000
Moluscos bivalvos	-	>1	>10000	>1	>0,1	>10000	>1000	>10
Crustáceos	>100	>10	>1000	>10	>10	>100	>1000	>100
Gasterópodos	-	-	-	>10	-	>10000	>100	-
Peces	>1000	>100	>10000	>10	>10	>100	>1000	>1000

Estos ensayos de toxicidad se realizan en el laboratorio bajo condiciones cuidadosamente controladas, que permiten obtener resultados precisos. Sin embargo, suelen ser poco representativos de las condiciones reales en las que se encuentran estos organismos en el medio natural, tanto en lo referente a las concentraciones de agentes

potencialmente tóxicos presentes en el agua como a su periodo de exposición. Además, de esta forma no se tienen en cuenta las interacciones entre sí de los distintos contaminantes, ni las de éstos con el medio físico y químico. Es por ello que resulta más interesante abordar estudios de contaminación en ecosistemas reales y el efecto que los metales producen en los seres vivos, teniendo en cuenta estas circunstancias.

Además de producir efectos adversos sobre los organismos acuáticos, la presencia de elevadas concentraciones de metales en el medio también afecta al medio ambiente y a la salud humana. Tal es el caso de la toxicidad del mercurio, que fue ilustrada trágicamente en el área de la Bahía de Minamata, en Japón, durante el período 1932-1968. A mediados de 1950 se comenzaron a detectar algunos casos de degeneración del sistema nervioso en animales, e inmediatamente después en las personas. Más tarde se llegó a la conclusión que la empresa Chisso Corporation (planta química productora de plásticos, medicamentos y perfumes) era la responsable del problema, debido a que había estado liberando compuestos de mercurio desde 1932. Finalmente, en julio de 1959, se concluyó que el consumo de pescado y mariscos contaminados con metilmercurio, debido al paso de Hg^{2+} a metilmercurio por acción bacteriana, era la causa de la enfermedad de la bahía de Minamata [Ekino y col., 2007; Tomiyasu y col., 2008; Murata y Sakamoto, 2011]. Se observaron defectos congénitos en bebés cuyas madres habían consumido marisco contaminado por mercurio (cuya concentración oscilaba entre 5 y 20 mg/L). Cerca de 3000 personas se vieron afectadas por envenenamiento con mercurio. Las personas afectadas por la llamada enfermedad de Minamata sufrían de ataxia, alteración sensorial en manos y pies, deterioro de los sentidos de la vista y el oído, debilidad y, en casos extremos, parálisis y muerte.

Otro ejemplo de contaminación por metales pesados fue el envenenamiento causado por Cd procedente de una mina que vertía directamente sus residuos al río Jinzu, en Toyama (Japón) durante la 2ª Guerra Mundial. El brote epidémico de intoxicación, que se comenzó a observar en 1947, fue ocasionado por la ingesta de arroz, el cual había sido irrigado con agua contaminada del río. La enfermedad que afectó a los habitantes de las aldeas cercanas se conocía como *itai-itai*, que significa literalmente *¡ay, ay!*, y afectaba principalmente al tejido óseo, produciendo deformaciones en los huesos [Inaba y col., 2005; Nogawa y Suwazono, 2011].

Otro episodio contaminante, considerado *el mayor envenenamiento masivo de una población humana en la historia* [Smith y col., 2000], causó que entre 28 y 35 millones de personas de los 125 millones de habitantes de Bangladés fueran expuestas a niveles potencialmente tóxicos de arsénico en el agua potable durante dos décadas [Niaz Asadullah y Chaudhury, 2011]. Este catastrófico problema de salud pública fue el resultado de programas bien intencionados, financiados inicialmente por el Fondo para la Infancia y la Familia de Naciones Unidas (UNICEF) para instalar pozos poco profundos que

proporcionaran una fuente de agua potable, libre de patógenos causantes de enfermedades. Ya en 1987, se observaron numerosos casos de lesiones epidérmicas inducidas por el arsénico, caracterizadas por cambios de pigmentación, predominantemente en la parte superior del pecho, los brazos, las piernas y queratosis de las palmas de las manos y las plantas de los pies. Estos efectos eran característicos del envenenamiento con arsénico, lo que llevó al descubrimiento de que el agua potable, con altos niveles de arsénico de origen natural, procedente de los pozos construidos, fue la responsable. El agua contenía concentraciones de arsénico superiores a la máxima aceptada ($10 \mu\text{g/L}$) por la Organización Mundial de la Salud (OMS) [Ahuja, 2008]. Desde 1990, se han llevado a cabo numerosos estudios con la finalidad de entender las causas de la contaminación por arsénico de la cuenca de Bengala en Bangladés. Se ha demostrado que los acuíferos contaminados de arsénico se encuentran en los deltas de los ríos Ganges, Brahmaputra y Meghna que forman la cuenca. Estos acuíferos son de la era cuaternaria y están formados por arenas micáceas, limos y arcillas procedentes del Himalaya [Henke, 2009]. El origen del arsénico en el agua subterránea de la cuenca todavía es incierto. Existen varias hipótesis que intentan explicar el mecanismo por el cual el arsénico pasa de su forma insoluble a especies solubles en agua. Según Polizzotto y col., los responsables de la disolución de arsénico son unas bacterias que habitan en el suelo de la cuenca hidrográfica. El arsénico, presente en los sedimentos que arrastran los ríos desde el Himalaya, se encuentra asociados a partículas de óxidos de hierro. Al llegar al delta del río, los sedimentos quedan enterrados a tal velocidad que las bacterias pasan a tener un metabolismo anaeróbico. De esta manera, las bacterias realizan su respiración microbiana utilizando los óxidos de hierro asociados al arsénico. Por tanto, el hierro y el arsénico son metabolizados dando lugar a formas que se disuelven fácilmente en agua. Así, el arsénico es lixiviado desde el sedimento hacia las aguas intersticiales, llegando finalmente a los acuíferos. La contaminación por arsénico se produce cerca de la superficie y tarda al menos 100 años en alcanzar el acuífero. Este ciclo es un proceso natural que ha venido ocurriendo durante miles de años, antes de cualquier influencia humana [Polizzotto y col., 2008]. Hasta el momento se han adoptado varias medidas para solucionar el problema, como el uso de coagulantes, adsorbentes e intercambiadores iónicos, pero ninguno de ellos ha tenido éxito. Estos métodos requieren equipos adicionales y en todos los casos la eliminación del arsénico del agua produce un residuo tóxico. El remedio inmediato ha sido identificar los pozos no seguros, pintándolos de rojo, mientras que los que aportan aguas sin contaminación se han pintado de verde [vanLoon y Duffy, 2011].

Sin ir más lejos, otro caso de contaminación por metales pesados fue el accidente minero de Aznalcóllar (Sevilla, España) en 1998, que, junto con la catástrofe del buque Prestige en 2002, fue uno de los desastres ecológicos más importantes y de mayor repercusión social que ha sufrido España en los últimos 100 años. El 25 de abril de 1998, en Aznalcóllar (Sevilla), se produjo la rotura de una presa de contención que retenía la

balsa de decantación procedente de una mina de pirita. El resultado fue un importante vertido de agua ácida y de lodos muy tóxicos, con altas concentraciones de metales pesados. El volumen de vertido, estimado en unos 3,6 hm³ de agua y 0,9 hm³ de lodos, se desbordó sobre las riberas de los ríos Agrio y Guadiamar, siendo la superficie afectada de aproximadamente 40 km². Aunque los lodos no llegaron a alcanzar el Parque Nacional de Doñana, considerado el santuario más grande de aves acuáticas de Europa, las aguas sí invadieron la región externa del Parque Nacional y desembocaron en el Guadalquivir en el área del Coto de Doñana, alcanzando finalmente el Océano Atlántico, en Sanlúcar de Barrameda (provincia de Cádiz) [Granado, 2005; Kraus y Wiegand, 2006].

Las administraciones central y autonómica no escatimaron medios para minimizar los impactos ambientales y socioeconómicos generados por la riada tóxica. El Plan de Medidas Urgentes permitió la retirada de la mayor parte de los lodos sedimentados y la vegetación contaminada, la depuración de las aguas ácidas retenidas en la marisma y la expropiación de todos los terrenos afectados. Posteriormente, la Junta de Andalucía, a través de su Consejería de Medio Ambiente, puso en marcha un proyecto de gestión integrada de cuenca denominado el Corredor Verde del Guadiamar, cuyos objetivos fundamentales eran, por un lado, evitar la dispersión y remediar la contaminación producida por el vertido minero sobre el río Guadiamar y la marisma afectada, y por otro, crear un corredor ecológico que permitiera recuperar el flujo de especies y procesos naturales que existía entre los ecosistemas de Sierra Morena y de los arenales del litoral de Doñana. Once años después se ha demostrado que el corredor fue una medida apropiada para garantizar la recuperación de la diversidad de la comunidad de aves [Ontiveros y col., 2012]. Los niveles de contaminación de las aguas de ambos ríos por metales pesados disminuyeron considerablemente los primeros 5 años después del accidente, gracias a las labores de limpieza y el cese de la actividad minera. Sin embargo, todavía se encuentran altos niveles de metales pesados en el río Guadiamar, así como en las aguas del acuífero del río Agrio. Además, los suelos siguen teniendo altas concentraciones de los elementos traza presentes en el lodo, si bien éstos se encuentran bastante inmovilizados en el suelo, en condiciones de baja biodisponibilidad. Debido a la lenta dinámica de las aguas subterráneas, se predice que la contaminación persistirá por muchos años, por lo que se deberían adoptar nuevas medidas para contribuir a la recuperación definitiva de estos ríos [Delta y col., 2009; Olías y col., 2012; Domínguez, 2012].

Otro episodio contaminante de gran importancia fue el ocasionado en Baia Mare (Rumanía) en el año 2000. El 30 de enero de 2000, en el noroeste de Rumanía, se colapsó el muro del dique de una planta de recuperación de desechos de la mina de oro de Aurul, en las cercanías de Baia Mare, una ciudad de 130000 habitantes. La operación minera de Aurul no se basaba en la explotación de nuevas reservas de oro, sino en el reciclado del

material de desecho que se había producido durante la explotación de otras minas anteriores empleando cianuro. El derrumbe del dique provocó el derrame de 120 toneladas de cianuro en el río Tisza, que luego llegaron al Danubio y finalmente, al Mar Negro, momento en el cual ya se habían diluido considerablemente. La contaminación de los ríos afectó al agua potable de 2,5 millones de personas, provocó la destrucción de muchas especies acuáticas, así como impactos negativos en los ecosistemas de la zona. Es considerado uno de los peores accidentes medioambientales ocurridos en Europa después del de Chernobil. De hecho, se estableció un "Comité de Expertos Baia Mare" para proponer correcciones y mejoras al marco regulador que existía en aquel momento [Vierendeels y col., 2011].

En 2010 se detectó un caso de contaminación por metales pesados en cigarrillos chinos. Un estudio realizado por O'Connor y col. en 2010 [O'Connor y col., 2010] descubrió que los cigarrillos chinos contenían cantidades potencialmente peligrosas de metales pesados, con niveles de plomo, arsénico y cadmio tres veces superiores a las detectadas en los cigarrillos de Canadá. Según el estudio, los metales pesados provenían de la tierra contaminada donde se cultivaba el tabaco y fueron absorbidos por esta planta. Se analizaron 78 marcas populares de cigarrillos [O'Connor y col., 2010] y se encontraron resultados especialmente preocupantes dada la cantidad de fumadores en China y dadas las ambiciones de exportación de la empresa estatal *China National Tobacco Corporation*.

Otra catástrofe ecológica sucedió en Hungría, en octubre del 2010, cuando la rotura de una balsa de la mina de aluminio de Kolontár, provocó el vertido de entre 600000 y 700000 m³ de barro rojo, residuo de la producción de aluminio, muy tóxico y corrosivo, que contenía grandes cantidades de silicio, óxido ferroso (responsable del color rojizo del barro) y metales pesados. Además, el pH del barro era muy básico, alrededor de 13, puesto que contenía grandes cantidades de NaOH, utilizado en el proceso Bayer para extraer aluminio de la bauxita. El lodo contaminado penetró en las riberas de los afluentes del Danubio y el polvo afectó a los pulmones de cientos de ciudadanos de la región, que aún hoy sufren sus efectos. La catástrofe dejó diez muertos, 150 heridos y contaminó gravemente más de 40 km² de zonas destinadas a la agricultura [Ruyters y col., 2011; Gelencsér y col., 2011].

Más recientemente, en enero de 2012, las autoridades de recursos hídricos y protección ambiental de la región autónoma de la etnia zhuang de Guangxi, en el sur de China, detectaron cadmio en el cauce bajo de un río contaminado por una empresa minera, obligando a reforzar los controles de la calidad del agua potable. La contaminación por cadmio fue detectada en el río Liujiang en la ciudad de Liuzhou, más de 10 días después de que los desechos industriales de la compañía minera local se vertieran al Longjiang, un afluente en el curso superior del río Liujiang. Los compuestos de cadmio llegaron a la estación hidroeléctrica de Luodong sobre el río Longjiang, constituyendo una amenaza para la seguridad del agua potable. Se vertieron 20 toneladas de cadmio y según la

Organización Mundial de la Salud, se detectó en las aguas niveles de este metal 80 veces superiores a los límites permitidos. En un intento por purificar el agua, el cuerpo de bomberos local vertió varias toneladas de una disolución neutralizante a base de cloruro de aluminio disuelto en el Longjiang. Las labores de limpieza han surtido efecto, y la concentración de cadmio se ha reducido. Sin embargo, 27 de los efectivos policiales que han participado en ellas han sufrido fiebres e infecciones en las vías respiratorias, y cinco de ellos requirieron hospitalización, aunque pronto fueron dados de alta [<http://www.telegraph.co.uk/earth/environment/9053671/20-tons-of-cadmium-poisoning-vital-Chinese-river.html>; http://spanish.news.cn/tec/2012-01/30/c_131383091.htm].

De todos los elementos conocidos por el hombre hasta la fecha, alrededor del 75% son metales y metaloides [vanLoon y Duffy, 2011], por lo que no es de extrañar que las posibilidades de contaminación metálica en el ambiente sean numerosas. Hay que tener en cuenta que los metales son materias naturales que, desde la edad de hierro, han desempeñado un papel fundamental en el desarrollo de las civilizaciones.

La contaminación del medio ambiente por metales pesados se inició hace 6000 años, y ha aumentado exponencialmente desde el comienzo del siglo XX, cuando proliferó su uso industrial. De hecho, en un estudio reciente de las praderas de *Posidonia oceánica* (Delile, 1813), planta acuática endémica del Mar Mediterráneo, se ha podido descifrar la evolución de la contaminación por metales en ese mar [Serrano y col., 2011]. Los primeros vestigios de residuos son de hace unos 2800 años, coincidiendo con el desarrollo minero, metalúrgico, tecnológico y cultural de los griegos y los romanos. A lo largo de los últimos 1200 años, el Mediterráneo ha experimentado un aumento gradual en la presencia de metales que se aceleró notablemente en los últimos 350 años a partir de la revolución industrial.

El empleo creciente de metales pesados en la vida cotidiana termina por afectar a la salud. De hecho, el crecimiento demográfico en zonas urbanas y la rápida industrialización han provocado serios problemas de contaminación y deterioro del ambiente, sobre todo, en los países en vías de desarrollo. El resultado neto es que la humanidad se ha convertido en el agente dominante del ciclo biogeoquímico global de los metales pesados. Actualmente, quedan pocos países en el mundo en los que la contaminación metálica no se haya convertido en objeto de debate.

En este sentido, diversos organismos internacionales como la UNESCO [Kuijper, 2003] e investigadores científicos en el área de medioambiente [Yanagi y Ducrotoy, 2003; Stachowitsch, 2003; Fleming y col., 2006; Pan y Wang, 2012] han manifestado su preocupación por el creciente impacto que las actividades antropogénicas ejercen, por ejemplo, sobre las áreas costeras. Cerca de la mitad de la población mundial está localizada a menos de 60 kilómetros de la costa y podría llegar al 70% en el año 2020, según el Programa 21 adoptado en la Conferencia de las Naciones Unidas sobre Medio Ambiente y

Desarrollo en 1992. Este Programa 21 fue un plan de acción global sin precedentes a favor del desarrollo sostenible. En 2002, diez años después, la Cumbre de Johannesburgo presentó una oportunidad magnífica para que los dirigentes de hoy en día adopten medidas concretas e identifiquen objetivos cuantificables para una mejor ejecución del Programa 21.

La Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO) de las Naciones Unidas ya pronosticó en 1998 que, de mantenerse las actuales tendencias, la población de las áreas costeras del mundo podría llegar a duplicarse en los siguientes 20 a 30 años. Este rápido incremento en la población conllevaría un aumento significativo en el desarrollo urbanístico, así como en los caudales de los efluentes urbanos e industriales y, en consecuencia, en los niveles de sustancias potencialmente tóxicas, produciendo, si no se toman las medidas oportunas, un empeoramiento de la calidad medioambiental de estas áreas extremadamente frágiles. En este sentido, resultan particularmente preocupantes las previsiones para Europa, donde se encuentra el mayor porcentaje de zonas costeras con alto riesgo de degradación (Figura 1.1).

Afortunadamente, y salvo en casos muy graves de polución, el carácter fundamentalmente dinámico de este medio permite la renovación de las masas de agua marina en las áreas costeras mediante su desplazamiento y mezcla con agua oceánica procedente de áreas más alejadas de la costa, llegando así a facilitar la dispersión y, por consiguiente, la atenuación espacial y temporal de episodios localizados de contaminación antropogénica.

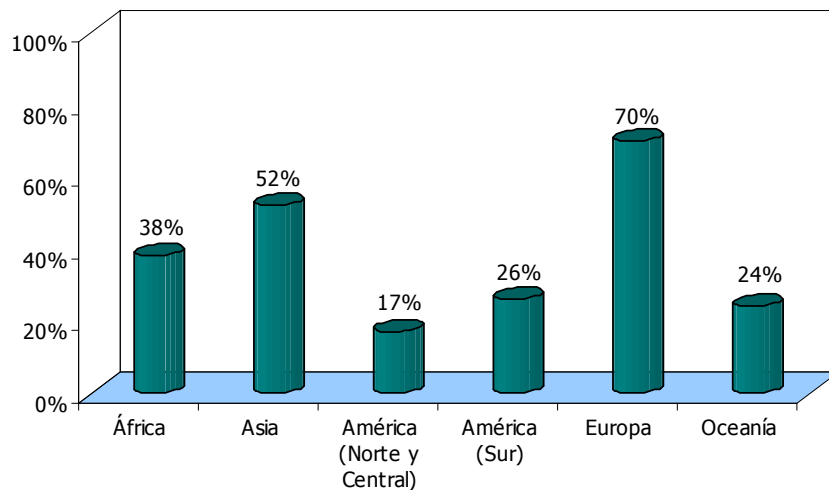


Figura 1.1. Riesgo de degradación de las áreas costeras a causa de actividades antropogénicas según la Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas (FAO, 1998)

1.2. Fuentes de contaminación por metales pesados

La corteza terrestre es la fuente principal de todos los elementos traza naturales en los sistemas ambientales, geológicos, biológicos y marinos. A lo largo de los años, las rocas han estado continuamente sujetas a varios procesos físicos y químicos que resultaron en la formación de capas de suelo y sedimentos. Los suelos y sedimentos son el sustrato terrestre y acuático para plantas, las cuales absorben y, en algunos casos, bioacumulan elementos requeridos para su alimentación. Como parte importante de la cadena alimentaria, las plantas son la ruta por la cual los animales y humanos incorporan estos elementos. El agua también es otra fuente significativa de metales; mediante los procesos de erosión, lixiviación, disolución, hidratación y carbonatación de ciertos materiales, el agua moviliza y distribuye los metales pesados. Con respecto a las fuentes atmosféricas, la actividad volcánica, los incendios forestales, el polvo atmosférico y la niebla salina contribuyen a la formación de aerosoles, los cuales son la principal fuente del ciclo global de estos elementos traza [Fifield y Haines, 2000].

La actividad humana ha contribuido notablemente al aumento de los niveles naturales de metales en las aguas, sedimentos, flora y fauna, tanto marinas como epicontinentales. Aunque la concentración de metales pesados procedentes de fuentes naturales, como la meteorización química de las rocas, se encuentre en estado estacionario a escalas cortas de tiempo, no ocurre lo mismo con la emisión antropogénica, la cual es causante del aumento continuo de la concentración ambiental de algunos de estos metales pesados. Existe una gran variedad de fuentes antropogénicas emisoras de metales pesados. A continuación se detallan algunas de las más revelantes [Domènech y Peral, 2006]:

- Extracción de minerales: constituye una fuente importante de emisión de muchos metales, en especial de As, Cd, Cu, Ni, Pb y Zn, tanto por su presencia en las menas como en los subproductos de la explotación minera.
- Fundición: el proceso del mineral para obtener el metal correspondiente es una fuente de emisión de metales, principalmente a la atmósfera en forma de partículas sólidas. Esta fuente es relevante para los metales más volátiles, como As, Cd, Pb y Tl.
- Industria metalúrgica: este tipo de industria emite metales en forma de partículas de aerosol a causa del procesamiento térmico de metales. Además, se genera gran cantidad de residuos sólidos con un alto contenido en diversos metales, como Cr, Cu, Mn, Pb, Sn y Zn.
- Otras industrias relevantes, como la electrónica (uso de metales en semiconductores, contactos, circuitos eléctricos y baterías), industrias de recubrimientos metálicos, y la industria química de pinturas, pigmentos, materiales plásticos, catalizadores y

electrodos: estas industrias contribuyen sustancialmente a la emisión de metales como Cu, Sn, Cr, Cd, Ni, Hg, Pt, Ru, Pd, As, Sb, Se, Mo y Zn.

- Gestión de residuos: la incineración de residuos urbanos, los lixiviados de los vertederos, así como la eliminación de lodos procedentes de plantas de tratamiento de aguas residuales, producen emisiones significativas de Cr, Cu, Mn, Ni, Pb y Zn.
- Corrosión metálica: en el proceso de oxidación/corrosión metálica se liberan al medio ambiente elementos metálicos, tales como Fe de materiales de construcción, Cu y Pb de cañerías, Cr, Ni y Co de aceros, Cd y Zn de los recubrimientos protectores del acero y Cr y Pb de la degradación de pinturas.
- Agricultura y ganadería: estas actividades son responsables de emisiones de metales como Cu y Zn, que se añaden al alimento de diferentes animales de granja y emergen en los residuos generados por la explotación animal. Además, el uso de pesticidas y fertilizantes es también una fuente de metales pesados puesto que contienen elementos metálicos en su composición.
- Industria forestal y maderera: para la preservación de diversos materiales en este tipo de industria, se suelen utilizar As, Cr y Cu que posteriormente pueden ser liberados al medio ambiente.
- Quema de combustibles fósiles: metales como Cd, Zn, As, Sb, Se, Cu, Mn y V están presentes en estos combustibles en pequeñas cantidades y con la quema se emiten incorporados en las cenizas de combustión.

En la Tabla 1.6 se muestran distintos procesos industriales que producen efluentes ricos en metales pesados.

El total de emisiones de metales traza a la hidrosfera suma un valor de 10^9 kg al año, siendo las principales fuentes de emisión el vertido de aguas residuales urbanas, las plantas térmicas, las fundiciones y las plantas de producción de acero. Los metales que se emiten en mayor cantidad son Mn y Zn, con flujos de emisión de aproximadamente $200\text{--}260 \cdot 10^6$ kg/año. El orden de flujos de emisión de metales a la hidrosfera es el siguiente [Domènech y Peral, 2006]:

$$\text{Mn} > \text{Zn} > \text{Cr} > \text{Pb} > \text{Ni} \approx \text{Cu} > \text{Se} \approx \text{As} > \text{Sb} > \text{V} \approx \text{Mo} \approx \text{Cd} > \text{Hg}$$

Tabla 1.6. Metales pesados empleados en diversas industrias [Mohan y Pittman, 2006]

Industrias	Al	Zn	As	Sn	Sb	Cd	Cr	Cu	Fe	Hg	Mn	Pb	Ni	Bi
Automovilística		x		x		x	x		x			x	x	
Refinerías de petróleo		x	x				x	x	x			x	x	
Papelera		x					x	x		x		x	x	
Textil							x							
Acero		x	x		x	x	x		x			x	x	
Compuestos químicos orgánicos	x	x	x	x		x	x		x	x		x		
Compuestos químicos inorgánicos	x	x	x			x	x		x	x		x		
Fertilizantes	x	x	x			x	x	x	x	x	x	x	x	
Material plástico y sintético									x					
Curtido y acabado de pieles							x							
Minería			x			x		x		x	x	x		
Drenaje ácido	x	x						x	x		x			
Chapados metálicos		x				x	x	x						
Vidrio			x											
Centrales nucleares														x
Carbón y gasolina										x		x		x

Las emisiones de metales traza al suelo son superiores a las que se desprenden a la hidrosfera, siendo el total de aproximadamente $6,5 \cdot 10^9$ kg al año. Las principales fuentes son la deposición de cenizas procedentes de la combustión de carburantes fósiles, la liberación de metales debido a la corrosión de materiales y el uso de pesticidas y fertilizantes. En este caso, también son el Mn y el Zn los metales que más se descargan al suelo, con flujos de emisión de $1300-1700 \cdot 10^6$ kg/año.

El orden de flujos de emisión de metales a los suelos es el siguiente:

$$\text{Mn} > \text{Zn} > \text{Cu} \approx \text{Cr} > \text{Pb} > \text{Ni} > \text{V} > \text{As} \approx \text{Mo} > \text{Se} > \text{Cd} \approx \text{Sb} > \text{Hg}$$

Las emisiones a la atmósfera de estos metales traza son inferiores a las que se descargan al agua y al suelo, sumando un total de $7,5 \cdot 10^8$ kg al año. Los metales que se emiten en mayor cantidad a la atmósfera son el Pb y el Zn, con tasas de descarga de $332 \cdot 10^6$ y $132 \cdot 10^6$ kg/año, respectivamente. El orden de flujos de emisión a la atmósfera es el siguiente:

$$\text{Pb} > \text{Zn} > \text{V} > \text{Ni} > \text{Mn} > \text{Cu} > \text{Cr} > \text{As} > \text{Cd} > \text{Se} > \text{Hg} \approx \text{Sb} > \text{Mo}$$

A pesar de que se han ido aplicando numerosas tecnologías de control de emisiones en industrias y centros urbanos, la cantidad total de estos elementos liberados al medio ambiente resulta sorprendente (Tabla 1.7).

Tabla 1.7 Descargas globales de elementos traza a aire, aguas y suelos (en 1000 toneladas por año) [Domènech y Peral, 2006]

Elemento	Aire	Agua	Suelo
As	19	41	82
Cd	7,6	9,4	22
Cr	30	142	896
Cu	35	112	954
Hg	3,6	4,6	8,3
Mn	38	262	1670
Mo	3,3	11	88
Ni	56	113	325
Pb	332	138	796
Sb	3,5	18	26
Se	3,8	41	41
V	86	12	132
Zn	132	226	1372

1.3. Distribución de metales pesados en ecosistemas acuáticos

La distribución de los metales pesados, así como su concentración y accesibilidad a la atmósfera, hidrosfera, litosfera y biosfera es muy variable, y depende tanto de factores de origen natural como antropogénico, incluyendo aportaciones atmosféricas o de los ríos, erosión de suelos, actividades biológicas, drenaje de aguas y descargas de aguas residuales urbanas e industriales [Carman y col., 2007].

El movimiento y el destino de los contaminantes ambientales son aspectos claves en la determinación de sus impactos. La Figura 1.2 ilustra las vías principales involucradas en el transporte y destino químico de dichos contaminantes. Las sustancias consideradas como contaminantes casi siempre se originan en la antroposfera, aunque sustancias naturales como los gases volcánicos que contienen azufre también pueden actuar como contaminantes. Estas sustancias pueden pasar al aire, la tierra, el agua (ya sea superficial o subterránea), a los sedimentos y a la biota (tanto a las plantas, como a los animales y los humanos). El lugar donde van a parar tales sustancias y el efecto que producen, depende de sus propiedades y de las condiciones del medio ambiente en que son introducidas. Como regla general, el transporte y destino de los contaminantes está controlado por su transporte físico y su reactividad, que incluye tanto reacciones químicas como bioquímicas o interacciones físicas con otras fases [Manahan, 2010].

Los sistemas acuáticos naturales pueden considerarse como un conjunto de compartimentos interrelacionados entre sí, en el que se desarrollan procesos físicos, químicos, geológicos y biológicos. El agua líquida es el constituyente más característico del medio acuático, pero existen otros compartimentos, entre los que se incluyen fundamentalmente materias sólidas (partículas en suspensión y fondos marinos sedimentarios y rocosos) y biota, entre los que se establecen interacciones mediante procesos de transporte de masas y transferencias de energía, lo cual puede conllevar cambios, ya sea a escala local o global, en la composición química de los mismos. Además, es de destacar las importantes interacciones que este medio tiene con la atmósfera (mediante intercambio de gases, deposición de partículas atmosféricas,...), con la litosfera (aportes por meteorización y lixiviación de rocas,...) y con la hidrosfera (aportes fluviales,...) (Figura 1.2).

En la Figura 1.3 se muestran las principales vías de transferencia de los metales pesados entre los principales compartimentos ambientales de un sistema acuático, entre los que se incluyen el sedimento, la materia en suspensión, la biota y la columna de agua sobrenadante.

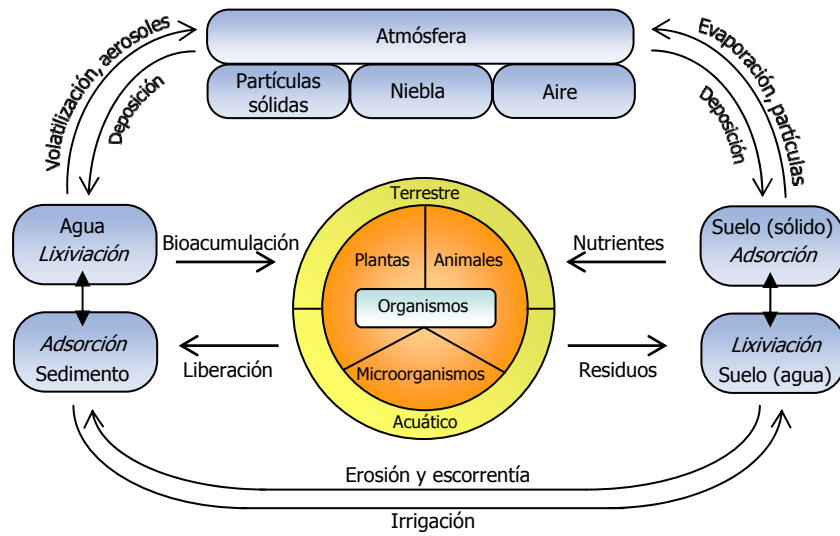


Figura 1.2. Intercambio de contaminantes liberados por la antroposfera entre varios segmentos de las otras esferas ambientales mostrando las vías involucradas en el transporte y destino químico [Manahan, 2010]

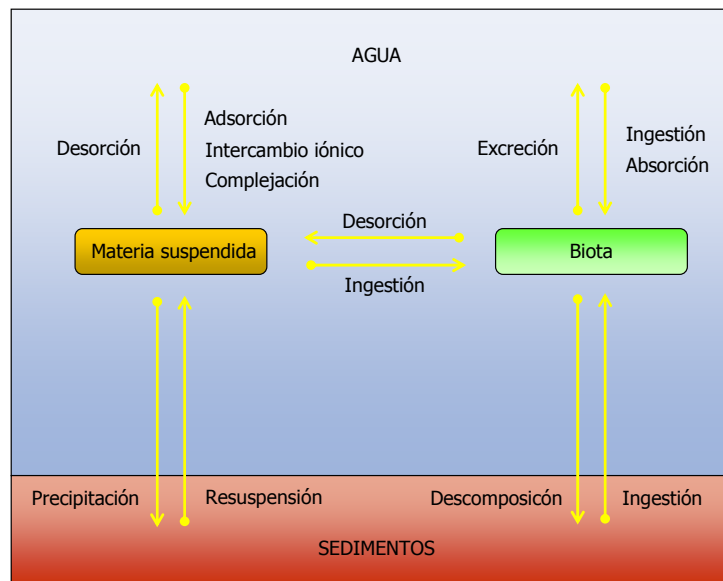


Figura 1.3. Principales interacciones y flujos de metales pesados entre compartimentos del medio acuático

Los metales son bioacumulables y persistentes, es decir, no pueden ser creados o degradados, ni mediante procesos biológicos ni de forma antropogénica. Una vez que han entrado en los ecosistemas acuáticos, se transforman a través de procesos biogeoquímicos y se distribuyen entre varias especies con distintas características físico-químicas, como puede ser material particulado ($>0,45 \mu\text{m}$), coloidal ($0,45 \mu\text{m} - 1 \text{ nm}$) y especies disueltas ($\leq 1 \text{ nm}$). En estas últimas especies se incluyen los iones metálicos hidratados, los cuales suelen ser considerados como la fracción metálica más biodisponible, así como los complejos metálicos orgánicos e inorgánicos con ligandos de origen natural o antropogénico, los cuales son potencialmente biodisponibles, en mayor o menor medida [Tercier-Waeber y Taillefert, 2008].

La concentración de metales en la columna de agua es, generalmente, pequeña debido a la baja solubilidad de estos elementos; por el contrario, los metales se acumulan en los sedimentos y en organismos acuáticos, alcanzándose niveles importantes, con factores de concentración de entre 10^3 y 10^5 respecto a la fase disuelta. Es por ello que los sedimentos se consideran sumideros y, por tanto, reservorios de metales pesados en el medio acuático. La afinidad de los metales por la materia particulada y la deposición de dichas partículas sobre el fondo contribuyen en gran medida a este fenómeno. No obstante, en los estudios de distribución de metales pesados en los ecosistemas acuáticos se da especial énfasis a los metales que se encuentran en fase disuelta en el agua, que se define convencionalmente por aquella fracción que pasa a través de filtros de $0,45 \mu\text{m}$ de tamaño de poro.

Aunque, la fracción disuelta suele ser la más importante en cuanto a cantidad en la columna de agua, existen excepciones como es el caso de algunos ecosistemas en los que la cantidad de materia particulada puede ser sustancial. Esto ocurre en las aguas de zonas costeras y de estuarios, de áreas oceánicas profundas con materia particulada resuspendida y de extensiones influenciadas directamente por aportes hidrotermales. En general, el contenido total en metales pesados presentes en las aguas suele expresarse como la contribución de ambos, metal en forma disuelta y asociado a la materia particulada.

La materia particulada y coloidal, tanto orgánica como inorgánica, desempeña un papel clave en la coagulación, la sedimentación y en los procesos de adsorción, los cuales influyen en los tiempos de residencia y transporte de los metales traza desde la columna de agua a los sedimentos. El destino de los metales traza en los ecosistemas acuáticos depende en gran medida de las especies, las cuales pueden coexistir y pueden o no estar en equilibrio termodinámico. Variaciones en la proporción de dichas especies presentes afecta a la biodisponibilidad de los metales traza, su grado de adsorción en los coloides y partículas, y en general a la movilidad en la columna de agua y sus tasas de transferencia a través de la interfase agua-sedimento [Tercier-Waeber y Taillefert, 2008].

Los procesos biogeoquímicos más importantes que regulan la movilidad de los metales pesados en los medios acuáticos, incluyen los procesos de adsorción, las reacciones redox, así como los procesos de meteorización de rocas y minerales. Los procesos biogeoquímicos anteriormente mencionados, se ven afectados por muchos factores, entre los cuales el pH, las condiciones redox y la concentración de ligandos orgánicos han sido considerados los más importantes, junto con la salinidad, que es un factor destacado a tener en cuenta en los sistemas estuáricos [Bradl y col., 2005; Guevara-Riba y col., 2005; Doong y col., 2008].

El pH y el potencial redox rigen la movilidad de los metales en el medioambiente. En la Figura 1.4 se muestran las tendencias de solubilidad y movilidad de los metales pesados en ausencia de interacciones significativas con la materia orgánica. Se puede observar cómo la solubilidad y, por tanto, la movilidad de los metales, se ven incrementadas a valores bajos de pH y cuando se modifican las condiciones redox del medioambiente mediante un moderado aumento de los potenciales de reducción. Bajo condiciones reductoras, los metales son retirados del compartimento acuático como minerales de sulfuro.

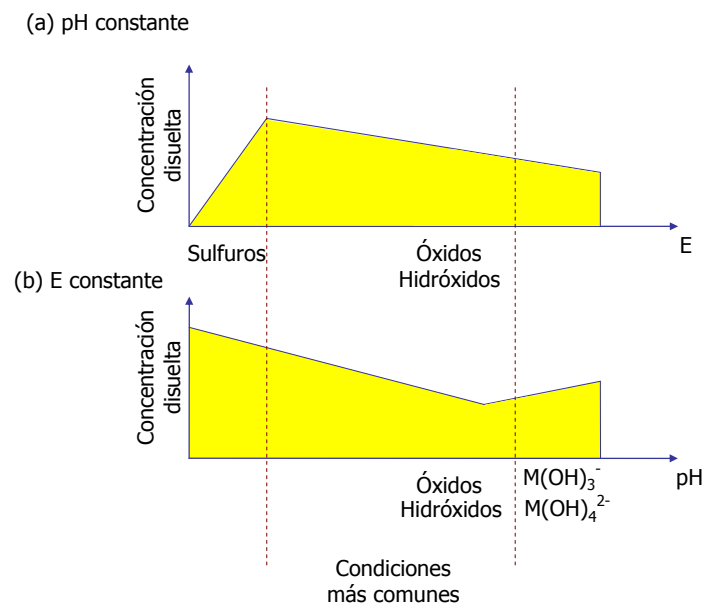


Figura 1.4. Efecto del potencial y el pH en la solubilidad de los metales pesados [Bradl y col., 2005]

Por otro lado, los metales pesados habitualmente forman complejos tanto con ligandos de origen natural (ácidos húmicos o fúlvicos) como con agentes complejantes de origen

antropogénico tales como el ácido etilendiaminotetraacético (AEDT) o el ácido nitrilotriacético (NTA). La complejación afecta tanto a las propiedades de los metales como a su actividad catalítica, su toxicidad y movilidad.

Además de los factores anteriormente mencionados, a la hora de estudiar la concentración y distribución natural de los metales pesados en el medio acuático deben considerarse las zonas de interfase líquido-líquido (zonas de estuarios, en las que las aguas continentales se encuentran con las aguas salinas procedente del mar), sólido-líquido (cauces, sedimentos y materia suspendida), gas-líquido (atmósfera-agua). Además, también han de tenerse en cuenta otros factores que pueden modificar su concentración y distribución, como son los movimientos de las masas de aguas (corriente de descenso del cauce y flujo de las mareas en las zonas de estuario), así como causas de origen biológico.

Concretamente, en las zonas costeras y de estuarios, las concentraciones de metales pesados suelen ser apreciablemente superiores a las presentes en el agua de mar oceánica. Así, los ríos junto con aportes derivados de actividades antropogénicas y otros aportes naturales en las áreas costeras, determinan un gradiente de concentración de metales que disminuye a medida que aumenta la distancia respecto a la costa.

En la Tabla 1.8 se comparan intervalos típicos mínimos y máximos de concentraciones de metales en distintas muestras de interés medioambiental. Estos datos deben ser considerados únicamente como orientativos, aunque pueden ofrecer una visión general para situar los ecosistemas acuáticos que se estudian dentro de los patrones habituales con que estos metales suelen presentarse en sistemas semejantes.

En general, las concentraciones de metales dependen tanto de su naturaleza como del medio en el que se encuentre; en este sentido, en agua de mar oceánica suelen ser menores que en aguas continentales (ríos, lagos, etc). Esto se debe a la dilución que éstos sufren cuando llegan al océano desde los ríos y a la intervención de agentes moduladores, bien sea actuando como fuentes o como sumideros, sobre la distribución de los metales pesados en los sistemas ambientales costeros. Este efecto se puede apreciar con mayor claridad si se comparan las concentraciones de estos metales en aguas costeras, bahías y estuarios con los valores encontrados en aguas oceánicas, donde la influencia de estos agentes es notablemente inferior. También puede observarse que, en general, la concentración en sedimentos es superior a la concentración en agua y en la biomasa.

1.3.1. Sumideros de metales en ecosistemas acuáticos

De igual manera que se producen en el medio acuático aportes de metales pesados por fuentes naturales y antropogénicas, existen además una serie de procesos físico-químicos que contribuyen a disminuir la concentración de los mismos en el medio acuático,

destacando: la adsorción sobre la superficie de partículas, la precipitación, coprecipitación y la incorporación a la biota. No obstante, algunos de estos fenómenos pueden tener carácter reversible, produciendo una redisolución de los metales asociados a esas especies mediante desorción, disolución y/o procesos biológicos [Greenaway y Rankine Jones, 1992].

Tabla 1.8 Intervalos de concentración característicos de metales en diversos compartimentos medioambientales [Alagarsamy, 2006; Crompton, 2007; Alomary y Belhadj, 2007; Raj y Jayaprakash, 2008; Pozebon y col., 2009; Ianni y col., 2010; Nobi y col., 2010; Chand y col., 2011; Uluturhan y col., 2011; Heimbürger y col., 2012; Leleyter y col., 2012]

Elemento	Agua de río (µg/L)	Agua costera, bahía y estuario (µg/L)	Agua de mar oceánica superficial (µg/L)	Sedimentos marinos (mg/kg)	Peces (mg/kg, peso seco)
Al	73,0-6300	6,40-63,0	0,10-0,60	257,3-86000	-
As	0,4-490,0	1,0-1,04	-	1,0-334,0	1,1-2,9
Cd	0,03-5,0	0,015-5,0	0,01-0,13	0,01-7,5	0,02-0,17
Co	0,20-10,0	0,01-0,25	0,003-0,16	0,44-45,3	0,07-0,38
Cr	0,05-23,0	0,095-3,30	0,005-1,26	2,6-243,2	0,1-2,2
Cu	0,11-200	0,069-20,0	0,006-2,80	1,1-657,0	0,39-3,46
Fe	1,0-3925	1,0-250,0	0,20-320	500-59300	-
Hg	0,01-1,30	0,00002-15,1	0,002-0,08	0,02-0,42	0,09-2,4
Mn	0,97-1835	0,35-250,0	0,018	23,2-16000	0,22-1,63
Mo	0,74-4,10	2,10-200,0	3,20-12,0	-	<3,6
Ni	1,5-4,4	0,20-5,33	0,15-0,93	0,8-103	0,15-0,2
Pb	0,13-60,0	0,038-7,44	0,00004-9,00	1,3-70	0,12-1,36
V	0,1-24	0,01-5,1	0,45-2,00	52,6-110	-
Zn	0,86-630	0,007-200,0	0,05-10,9	5,3-309	6,3-39

A continuación se detallan los procesos que producen una disminución de la concentración de metales en la columna de agua:

- *Procesos de sorción de metales pesados.* La mayor parte de la materia particulada en los medios acuáticos (arcillas, óxidos hidratados metálicos y materia orgánica particulada) tiene carácter coloidal, con una carga negativa neta. Por tanto, los cationes metálicos son electrostáticamente atraídos hacia su superficie. Algunas de estas partículas, enriquecidas de metales pesados, se hunden hasta depositarse en el fondo. El grado en el que tiene lugar este fenómeno depende, entre otros factores, de la naturaleza del metal, la abundancia de materia particulada, la concentración de otros solutos y la profundidad de la columna de agua [Förstner y Witmann, 1983; Kabata-Pendias, 2000].
- *Precipitación.* En las aguas naturales están presentes en altas concentraciones cloruros, sulfatos y bicarbonatos. Aunque, en general, las formas químicas de los metales pesados asociados a estas especies son bastante solubles, las características del agua natural pueden producir la precipitación de éstas bajo determinadas condiciones. En el caso de los hidróxidos, esta solubilidad disminuye con el aumento del pH, lo que puede producir la precipitación de estos compuestos en condiciones básicas. Por otro lado, los sulfuros de los metales pesados son prácticamente insolubles al pH de las aguas naturales, mientras que la solubilidad de los carbonatos es altamente dependiente de la presión parcial de CO₂, aumentando en su presencia [Förstner y Witmann, 1983]. En el caso particular de las zonas de estuario se ha detectado la disminución de la concentración de metales procedentes del aporte fluvial que se origina, entre otras razones, por la aparición de fenómenos de precipitación fundamentalmente debidos a los cambios de pH y fuerza iónica que tienen lugar en las zonas de mezcla de aguas dulces y marinas. Igualmente, en las aguas porosas e intersticiales de los sedimentos, bajo condiciones anóxicas generadas por la oxidación de la materia orgánica particulada, ciertas bacterias reducen el sulfato a sulfuro, el cual puede formar con los metales pesados sulfuros metálicos, que presentan muy baja solubilidad, favoreciendo la precipitación y coprecipitación [Greenaway y Rankine Jones, 1992].
- *Incorporación a la biota.* Los organismos vivos también influyen en el contenido y distribución de los metales pesados [Vasconcelos y col., 2002; Oztürk y col., 2003]. Los organismos tienen mecanismos bien desarrollados para absorber, metabolizar y excretar diferentes elementos, incluso metales en concentraciones que se encuentran de forma natural. En este sentido, por ejemplo, el fitoplancton incorpora metales pesados para emplearlos en determinados sistemas enzimáticos que catalizan procesos como la glicólisis, el ciclo del ácido tricarboxílico, la fotosíntesis y el metabolismo de las proteínas; y el zooplancton y la fauna bentónica, que se alimentan por filtración, acumulan metales pesados presentes en los sedimentos [Bruland, 1983]. Se considera

que la actividad biológica es responsable de más del 90% del transporte vertical de metales pesados en la columna de agua [Bryan, 1976].

1.4. Especiación de metales en ecosistemas acuáticos

Tal como se ha indicado anteriormente, la toxicidad de los metales pesados depende de la concentración en que se encuentren en el medio. No obstante, en relación con la toxicidad, aún es más importante la forma química en que se encuentra el elemento metálico (especiación química), y ello depende de las propiedades del elemento en cuestión y de las condiciones físico-químicas del medio en que se encuentre la especie.

La distribución, movilidad, biodisponibilidad, toxicidad, bioacumulación y biodegradabilidad de los metales pesados depende no sólo de sus concentraciones sino también de sus asociaciones físico-químicas con el sistema natural. Cambios en las condiciones medioambientales, ya sean naturales o antropogénicas, pueden influir fuertemente en el comportamiento de los elementos tóxicos e incluso los esenciales, alterando las formas en las que se presentan en la naturaleza. Algunos de los factores más controlantes son el pH, el potencial redox, la capacidad de las especies reactivas del medio para interaccionar como ligandos complejantes (tanto orgánicos como inorgánicos) y la materia coloidal y particulada que pueden producir adsorción de elementos. Así, por ejemplo, una disminución del pH del agua de lluvia como resultado de la quema de combustibles fósiles ricos en azufre, puede producir un aumento de la lixiviación de aluminio de minerales aluminosilicatos en suelos, resultando en efectos perjudiciales e, incluso en casos extremos, muerte de peces en las aguas. Otro ejemplo es el arsénico, el cual es extremadamente tóxico en su forma inorgánica, pero relativamente inocuo como arsenobetaina (comúnmente presente en peces y crustáceos). Los compuestos organoestánicos, de los cuales el más conocido es el agente antiincrustante tributilestaño, son generalmente más tóxicos que las especies inorgánicas [Ure y Davidson, 2002].

Es por ello que el propósito de las investigaciones actuales sobre contaminación del medio ambiente se centra en desarrollar nuevos métodos analíticos, no solo con la finalidad de determinar únicamente el contenido total de los elementos sino con el objetivo de responder estas dos preguntas [Pérez-Bendito y Rubio, 1999]:

(a) ¿En qué formas se encuentran presentes dichos elementos en la muestra?

(b) ¿Cuál es el contenido de cada forma en la muestra?

Es necesario conocer las especies químicas de los elementos para comprender las reacciones químicas y bioquímicas en las que intervienen, y por tanto, obtener información

relativa al carácter esencial y tóxico de los elementos químicos. Por ello, la determinación de la concentración total de un determinado metal sólo proporciona una explicación incompleta del posible impacto ambiental que puede producir en el medio en el que se encuentra. Se puede afirmar que el uso de métodos de especiación, con el fin de determinar las formas químicas o de obtener diferentes fases o fracciones diferenciadas, es una de las claves que puede ayudar a entender la biogeoquímica de un ecosistema [Manahan, 2010].

Parece difícil adoptar una definición única y de forma unánime para el concepto de *especiación*. Ure y Davidson en 2002 la definieron como el proceso de identificación y cuantificación de diferentes formas o fases definidas presentes en un material, o bien como la descripción de las cantidades y los tipos de esas especies, formas o fases presentes [Ure y Davidson, 2002]. La IUPAC publicó en el año 2000 un documento sobre especiación química, *Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of trace elements. Definitions, structural aspects and methodological approaches*, donde define el término *especie química* como la forma específica de un elemento definida como su composición isotópica, su estado electrónico o de oxidación y/o su estructura compleja o molecular [Templeton y col., 2000].

En consecuencia, la *especiación de un elemento* se define como la distribución de dicho elemento entre especies químicas definidas en un sistema. Para determinar la especiación, se define el *análisis de especiación* como la actividad analítica de identificación y/o medida de las cantidades de una o más especies químicas individuales en una muestra [Caruso y col., 2003; Hirose, 2006].

Ure y Davidson consideran que la definición de especie química recomendada por la IUPAC es limitada, puesto que es únicamente apropiada para la especiación en muestras líquidas y excluye los estudios realizados sobre materiales sólidos como suelos, sedimentos y materiales geoquímicos y biológicos del campo de la especiación, puesto que los relega a la categoría de fraccionamiento.

Frecuentemente, se ha empleado en la bibliografía la definición de *especie* referida a formas químicas diferentes para un elemento en particular, como por ejemplo, los iones de Cr(VI) y Cr(III). Existe un amplio debate sobre si el término *especiación* también debería utilizarse para definir aquellos procesos que determinan varias fracciones de un elemento obtenidas mediante extracciones múltiples. Este hecho ha provocado una incertidumbre sobre el uso correcto de los términos *fraccionamiento* y *análisis de especiación*. Los procedimientos analíticos que no conducen a la identificación de especies químicas pero permiten caracterizaciones de grupos de especies no se consideran que sean propiamente dicho *análisis de especiación*. Así pues, la IUPAC con el fin de aclarar la diferencia entre estos dos términos, definió el *fraccionamiento* como el proceso de clasificación de un analito o un grupo de analitos de una cierta muestra de acuerdo a sus propiedades físicas

(por ejemplo: tamaño o solubilidad) o químicas (por ejemplo, reactividad, capacidad de enlace). Este concepto de fraccionamiento coincide con dos de los tipos de especiación que se conocen en la bibliografía y que se denominan *especiación funcional* y *operacional*. La primera de ellas hace referencia a la caracterización de las especies en función de su papel en las rutas bioquímicas, mientras que en la segunda se diferencian las especies en función de la operación analítica realizada [Caruso y col., 2003]. En este sentido, los procedimientos de extracción secuencial selectiva se utilizan para aislar metales que se encuentran asociados a las fracciones intercambiable, reducible, oxidable y residual en los sedimentos. Las fases reducible, oxidable y residual se corresponden con los metales asociados, enlazados o adsorbidos en oxihidróxidos de hierro y/o manganeso, en la materia orgánica y/o sulfhídrica y en silicatos, respectivamente. Aunque éste sea un apropiado concepto de especiación, debe enfatizarse que estas asociaciones son simbólicas y pueden malinterpretarse. Por lo tanto, es preferible considerar las fracciones aisladas como aquéllas definidas por el procedimiento operacional. Procedimientos físicos como la división de una muestra sólida en partículas de menor tamaño, o el aislamiento de una muestra disuelta de sedimento por filtración, centrifugación o diálisis son también ejemplos de *especiación operacional*. De hecho, incluso la distinción entre especies solubles e insolubles en sistemas acuáticos puede ser considerada como especiación operacional puesto que está basada en la definición arbitraria de *solubilidad*, según la cual una sustancia es soluble si es capaz de atravesar un filtro de 0,45 μm [Ure y Davidson, 2002; vanLoon y Duffy, 2011].

El tercer tipo de especiación, en la cual se mide o se define la forma química precisa de un elemento o su estado de oxidación, es la más difícil de conseguir puesto que se requieren métodos analíticos de gran selectividad y sensibilidad. Algunos de los primeros estudios relacionados con esta forma específica de especiación en agua lograron con éxito separar los estados de oxidación del Cr [Isshiki y col., 1989] o del Sb [Mohammad y col., 1990] utilizando métodos cromatográficos y electroquímicos, mediante el empleo de absorbentes o reactivos específicos. Para muestras sólidas, que incluyen sedimentos y materiales biológicos, este tipo de especiación rara vez es posible y se debería recurrir a la especiación funcional u operacional.

El interés en estos procedimientos de especiación química se está expandiendo rápidamente dado que existen estudios que reconocen que la evaluación de los riesgos para la salud, la toxicidad y la biodisponibilidad debe basarse en los niveles de las diferentes formas químicas de los elementos estudiados, en lugar de sus concentraciones totales [Gonzalez y col., 2009]. La literatura relacionada con este tema de interés es relativamente reciente, dado que no se conocen estudios sobre especiación antes de 1980, y está creciendo de forma muy significativa en los últimos años.

La determinación de las especies químicas de un elemento constituye un reto mayor que la determinación del contenido total por las siguientes razones (Figura 1.5):

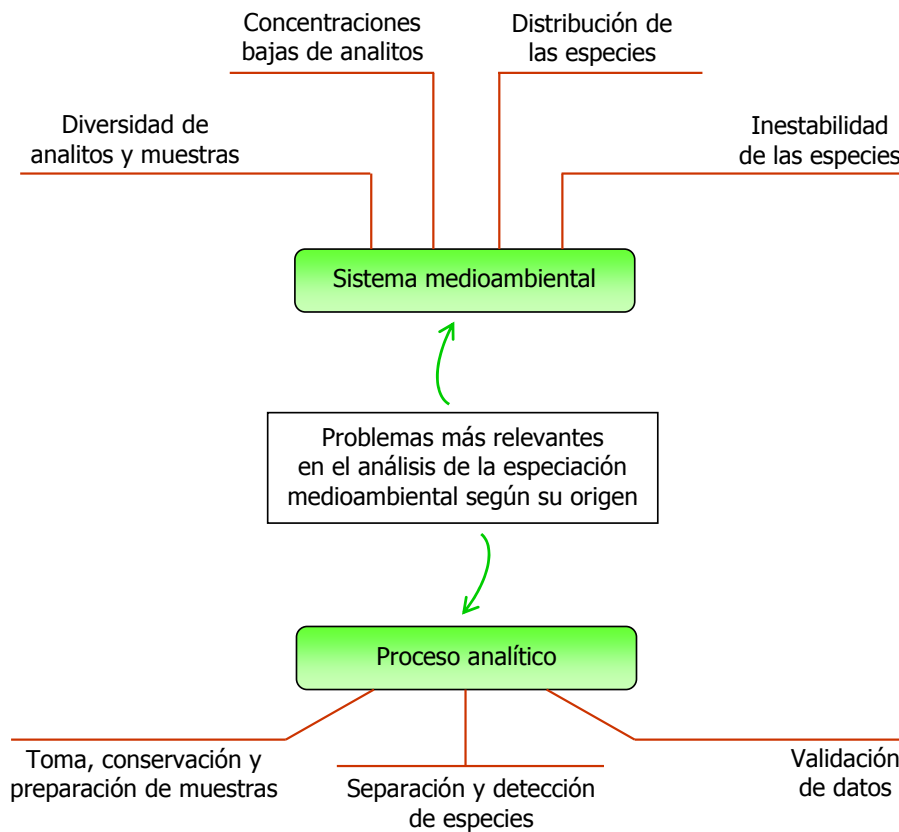


Figura 1.5. Dificultades que se presentan en el análisis de especiación medioambiental [Rodríguez Baena, 2001]

- Existen dificultades asociadas al aislamiento y separación de los compuestos de interés de matrices naturales que presentan alta complejidad.
- La mayoría de las técnicas disponibles de especiación provocan cambios en los equilibrios existentes entre varias especies químicas presentes en el sistema bajo estudio.

- Existen pocos procedimientos analíticos que tengan la suficiente sensibilidad y selectividad para el estudio de especiación de elementos que están presentes a muy bajas concentraciones (niveles ultra-traza) en los ecosistemas acuáticos.
- Normalmente no se disponen de materiales de referencia para la validación de las técnicas de especiación.

Aún así, se han realizado importantes avances en el campo de los análisis de especiación durante los últimos 20 años, de modo que actualmente es posible realizar análisis de especiación para casi cualquier elemento, aunque no para todas las especies de cada elemento [Apostoli y col., 2006].

1.4.1. Especiación de metales en aguas

Los metales en las aguas se encuentran repartidos entre las fases disuelta y la particulada (adsorbidos a partículas). Las concentraciones tan bajas que presentan se deben normalmente a la poca solubilidad de estos elementos, independientemente del metal de que se trate y de la especie química en la que se encuentren. Además, en los sedimentos se suelen acumular los metales, por lo que dada la relación existente entre la columna de agua y los sedimentos, en algunos casos puede ser muy importante realizar el estudio de éstos últimos como posibles sumideros de metales.

La gran complejidad que muestran los sistemas acuáticos hace que los estudios de especiación presenten una elevada dificultad. Esta complejidad se debe a las bajas concentraciones que presentan los metales en aguas naturales, y a que este tipo de muestras contienen un gran número de elementos de la tabla periódica (a menudo presentes en una gran variedad de formas químicas), así como una variedad infinita de compuestos orgánicos. Además los compuestos presentes en las aguas naturales cubren un amplio rango de tamaños, desde unos pocos Å (iones inorgánicos hidratados) hasta la escala macroscópica de 1 mm o mayores (desechos de los organismos). Los compuestos de un tamaño intermedio, como son los coloides inorgánicos y las macromoléculas orgánicas, juegan un papel importante en la regulación química del agua.

Las especies metálicas presentes en la fase soluble se encuentran mayoritariamente en forma de iones o complejos orgánicos e inorgánicos. La naturaleza y concentración de los ligandos orgánicos e inorgánicos en las aguas dulces y aguas de lluvia varían ampliamente, mientras que en el agua de mar, sobre todo las aguas oceánicas, presentan una composición que puede asumirse como virtualmente semejante en toda la tierra [Pérez-Bendito y Rubio, 1999].

Los ligandos inorgánicos que se presentan en mayor concentración son Cl^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , OH^- y F^- (10^{-3} - 10^{-5} mol/L). Los complejos formados entre ellos y los metales son casi

siempre muy lábiles. Dentro de los ligandos orgánicos se incluyen tanto especies bioquímicas de baja masa molecular ($<10^3$), como son los ácidos carboxílicos, aminoácidos, azúcares, pequeños hidroxácidos, etc, como otros compuestos de estructura desconocida que abarcan un amplio margen de masas moleculares (10^3 - 10^7) [Nowack, 2005]. Las moléculas orgánicas pequeñas no juegan un papel especial en el control de las concentraciones de los elementos traza debido a que sus complejos metálicos tienen constantes de complejación bajas y existen a bajas concentraciones.

La materia orgánica en los ecosistemas acuáticos proviene en gran medida de los organismos vivos y de las fuentes de contaminación. En el agua dulce, la materia orgánica existe normalmente a concentraciones más altas que en el agua de mar. Por otro lado, en las aguas intersticiales de los sedimentos, en algunas aguas costeras con exceso de fitoplancton y en aguas altamente contaminadas pueden medirse cantidades de materia orgánica hasta diez veces superiores que en agua dulce; y en consecuencia, la formación de complejos orgánicos en estos medios es probablemente muy importante [Pérez-Bendito y Rubio, 1999].

Dentro de los componentes de la materia orgánica en ecosistemas acuáticos, son especialmente importantes las sustancias húmicas. Este tipo de sustancias son resistentes a la degradación y se forman durante la descomposición de la vegetación depositada en los suelos o en sedimentos. La materia húmica está formada por macromoléculas polielectrolíticas, con grupos hidrofóbicos e hidrofílicos, de elevado peso molecular [Manahan, 2010]. No está formada por moléculas discretas y bien definidas, sino por un tipo de sustancias que se producen y residen en suelos y agua, considerándose componente mayoritario de las reservas de carbono tanto terrestres como acuáticas. En la hidrosfera, la materia húmica constituye el 50% de la materia orgánica disuelta presente en aguas superficiales y en sedimentos orgánicos. Puede dividirse en diversas fracciones, que se definen operacionalmente de acuerdo con el método de fraccionamiento empleado. Según su solubilidad, se clasifican en *humina* (insoluble en álcali o ácido), *ácidos húmicos* (solubles en álcali, pero precipita en medio ácido) y *ácidos fúlvicos* (solubles en álcali y ácido). Las masas moleculares varían desde unos pocos cientos para los ácidos fúlvicos a decenas de miles para las fracciones de ácido húmico y de humina. La fracción de ácido fúlvico, por tanto, es la de menor masa molecular y complejidad. Estas sustancias contienen un esqueleto de carbono con un elevado grado de aromaticidad y con un alto porcentaje de peso molecular incorporado en grupos funcionales, la mayoría de los cuales contienen oxígeno. La composición elemental de la mayoría de las sustancias húmicas está dentro de los siguientes intervalos: C, 45-60%; O, 25-45%; H, 4-7%; N, 2-5%; y elementos inorgánicos, 0,5-5%. Los principales grupos hidrofílicos en los ácidos fúlvicos y húmicos son carboxilos, alcoholes, cetonas, quinonas y metoxilos. Debido a sus propiedades ácido-base, de sorción y de formación de complejos, las sustancias húmicas,

tanto solubles como insolubles, tienen un fuerte efecto en las propiedades del agua. En general, los ácidos fúlvicos se disuelven en agua y ejercen sus efectos en disolución. Por su parte, la humina y los ácidos húmicos permanecen insolubles y afectan la calidad de agua a través del intercambio de especies, como cationes o materiales orgánicos, con el agua [vanLoon y Duffy, 2011].

Otra fracción considerable de metales pesados en las aguas se encuentra adsorbida sobre coloides y materia particulada, tales como silicatos no arcillosos (cuarzo, sílice, opalina), arcillas (montmorillonita, caolinita, illita), carbonatos (calcita, dolomita), óxidos de Fe-Mn (goetita, magnetita), fosfatos (apatito) y sulfuros (mackinawita). La superficie de las arcillas está predominantemente cargada negativamente, por lo que pueden adsorber iones metálicos a los valores de pH que prevalecen en la mayoría de los ecosistemas naturales. De forma parecida, los óxidos hidratados metálicos, pueden intercambiar protones e iones OH^- por cationes y aniones, respectivamente, con lo que disminuye su biodisponibilidad. La materia particulada representa una pequeña fracción de los ecosistemas acuáticos; sin embargo, su gran número y superficie total facilita la adsorción de especies. Los tamaños varían incluso desde unos pocos nanómetros a varias decenas de micra. La distribución usual entre las partículas inorgánicas y orgánicas es de poca significación ambiental ya que las partículas inorgánicas se sabe que están rodeadas por materia orgánica adsorbida [Pérez-Bendito y Rubio, 1999].

Así pues, los metales pesados disueltos en agua pueden encontrarse tanto en forma inorgánica, bajo distintos estados de oxidación y formas químicas, incluyendo iones solvatados libres y complejos inorgánicos, como asociados a sustancias orgánicas en forma de compuestos organometálicos (por ejemplo, formas metiladas de As, Ge, Hg, Sb, Sn y Te, formas de etil-Pb y formas de butil-Sn) o complejos orgánicos (por ejemplo con metabolitos de fitoplancton, proteínas, sustancias húmicas, etc) y por último asociados a coloides.

1.4.2. Especiación de metales en sedimentos

Los sedimentos son las capas de materia orgánica y mineral finamente dividida que cubren los fondos de los cuerpos de agua, como ríos, arroyos, lagos, embalses, bahías, estuarios y océanos [Baird y Cann, 2005]. Típicamente consisten en mezclas de minerales granulados de tamaño fino, medio y grueso, incluyendo arcilla, limo y arena, mezclados con materia orgánica. Su composición puede variar de materia mineral pura a materia predominantemente orgánica. Los sedimentos son depósitos de una variedad de desechos biológicos y químicos en los cuerpos o reservorios de agua, siendo sumideros de contaminantes tales como metales pesados y compuestos orgánicos tóxicos. Es de especial importancia la transferencia de especies químicas de los sedimentos a las cadenas

alimenticias acuáticas vía organismos como gusanos y moluscos, que pasan una parte importante de sus ciclos de vida en contacto con o viviendo en los sedimentos [Manahan, 2010].

Es incorrecto considerar a los sedimentos como simplemente suelos húmedos. Los suelos normales se encuentran en contacto con el oxígeno de la atmósfera por lo que están en un ambiente óxico; en cambio, los sedimentos dulceacuícolas o marinos están rodeados de grandes cantidades de agua con niveles de oxígeno muy inferiores a los presentes en la atmósfera. Es por ello que los sedimentos suelen estar sometidos a condiciones reductoras. Por otro lado, los sedimentos sufren continuas lixiviaciones, mientras que los suelos no.

Una de las características más importantes de los sedimentos es su capacidad de intercambiar cationes con el medio acuático circundante. La capacidad de intercambio catiónico (CIC) se define como la capacidad de un sólido para adsorber e intercambiar cationes. El CIC varía con el pH y la concentración de sales [Suresh y col., 2012].

Debido a la naturaleza generalmente anóxica de los sedimentos, su recolección y tratamiento para el estudio de la especiación metálica debe realizarse con cuidados especiales. Particularmente, el contacto con el oxígeno atmosférico oxida rápidamente el Fe^{2+} y el Mn^{2+} intercambiables a óxidos no intercambiables que contienen los metales en estados de oxidación más altos, como el Fe_2O_3 y MnO_2 . Por lo tanto, las muestras de sedimentos deben sellarse y refrigerarse lo más pronto posible después de ser recolectadas [Manahan, 2010].

Como se ha indicado anteriormente, tanto los sedimentos como las partículas en suspensión son sumideros de metales, como cromo, cadmio, cobre, cobalto, molibdeno, níquel y manganeso, y otros muchos. Estos metales pueden estar presentes como iones retenidos por intercambio catiónico con las arcillas, pueden estar enlazados a óxidos hidratados de hierro o manganeso, o bien formando quelatos con las sustancias húmicas insolubles. La forma química de los metales depende del pE. En la Tabla 1.9 se dan ejemplos de compuestos específicos de elementos traza que pueden ser estables en sistemas acuáticos bajo condiciones oxidantes y reductoras. La solubilización de metales presentes en el material sedimentario o suspendido depende, entre otras causas, de los ligandos que forman complejo. Estos compuestos pueden ser aminoácidos, citratos o el ión cloruro, en el caso de agua de mar.

Puesto que los sedimentos están compuestos por mezclas heterogéneas de diferentes sustancias orgánicas y organominerales, arcillas, óxidos de hierro, aluminio y manganeso, así como una gran variedad de sustancias solubles, los mecanismos de enlace de los metales traza en sedimentos son diversos y varían según la composición de los mismos y sus propiedades físicas.

Tabla 1.9. *Compuestos inorgánicos de metales traza que pueden ser estables bajo condiciones oxidantes o reductoras [Manahan, 2010]*

Metal	Condiciones oxidantes	Condiciones reductoras
Cd	CdCO ₃	CdS
Cu	Cu ₂ (OH) ₂ CO ₃	CuS
Fe	Fe ₂ O ₃ ·x(H ₂ O)	FeS, FeS ₂
Mn	MnO ₂ ·x(H ₂ O)	MnS, MnCO ₃
Hg	HgO	HgS
Ni	Ni(OH) ₂ , NiCO ₃	NiS
Pb	PbCO ₃ , Pb(OH) ₂ , PbCO ₃	PbS
Zn	ZnCO ₃ , ZnSiO ₃	ZnS

Para estudiar la especiación de metales en sedimentos, se han desarrollado diferentes procedimientos analíticos que implican sucesivas extracciones. La especificidad del proceso de extracción puede mejorarse mediante la combinación de varios extractantes en un esquema de extracción secuencial, en el que el residuo de una extracción se extrae en la siguiente secuencia de extracción del esquema. El objetivo de este método de extracción secuencial es que el empleo de sucesivos reactivos (simples o mezcla) puede liberar paso a paso el metal asociado a las fracciones o fases específicas del sedimentos, de modo que se delimita más el acceso de cada reactivo a una fase en concreto y aumenta de este modo la especificidad del método [Baeyens y col., 2003].

Desde finales de la década de los 70 y principios de los 80 se han desarrollado una gran variedad de esquemas secuenciales de extracción. Tessier y colaboradores se encuentran entre los primeros autores que desarrollaron un procedimiento secuencial de extracción para el estudio de la especiación metálica en suelos [Tessier y col., 1979].

Todos los procedimientos de extracción secuencial están basados en la posible presencia en los sedimentos de las siguientes especies metálicas:

- Solubles en agua
- Intercambiables
- Enlazadas a materia orgánica
- Asociadas a óxidos de hierro y manganeso

- Formando parte de carbonatos, fosfatos o sulfuros
- Enlazadas a los silicatos que forman el suelo (presentes en lo que se denominaría la fracción residual)

La gran diversidad y la falta de uniformidad tanto de los métodos de extracción simple, así como de los esquemas de especiación secuencial no permitía la comparación de los resultados [Jouanneau y col., 1983; Nirel y Morel, 1990; Hlavay y col., 2004]. A esto, se sumaba la ausencia de materiales de referencia adecuados para la validación de la metodología. Estos problemas unidos a las muchas fuentes de errores aleatorios que presentaban estos métodos, hacía pensar que el uso de los esquemas de extracción sería abandonado de manera progresiva. Sin embargo, dada la valiosa información que proporcionaban estos métodos, el *Community Bureau of Reference* (BCR), actualmente *Mesasurements and Testing Programme*, inició un programa de trabajo para estandarizar esquemas de extracción simple y secuencial para la determinación de metales trazas extraíbles en suelo y sedimento.

Este programa empezó en 1987 con la comparación de los procedimientos existentes probados en dos ejercicios interlaboratorios [Ure y col, 1993a, Ure y col., 1993b]. Se discutió el desarrollo de este programa extensivamente en un taller organizado por el BCR en 1992 [Quevauviller y col., 1993] que fue reconocido por ser un punto de inflexión en el uso de estos esquemas en Europa [Salomons, 1993]. La estrategia de trabajo desarrollada por el BCR en este programa se ha descrito en detalle por Quevauviller [Quevauviller y col., 1993; Quevauviller y col., 1994]. En esta estrategia se incluía en primer lugar el diseño de los procedimientos estándar de extracción simple y secuencial para el análisis de suelos y sedimentos, la realización de ensayos interlaboratorios de estos procedimientos de extracción y, por último, la preparación de muestras de referencias certificadas para los metales extraíbles. Estos trabajos culminaron con la propuesta de un procedimiento de extracción secuencial, el denominado *método BCR*, que consiste en emplear 3 extracciones sucesivas empleando ácido acético, cloruro de hidroxilamonio y peróxido de hidrógeno combinado con acetato amónico, obteniendo la fracción intercambiable, la reducible y la oxidable, respectivamente. Este procedimiento se explicará con detalle en el capítulo 4 de esta Tesis Doctoral.

En un trabajo posterior, Quevauviller realizó una serie de recomendaciones importantes a tener en cuenta en el empleo del método BCR [Quevauviller y col., 1997; Quevauviller, 1998]:

- Las disoluciones de calibración deben hacerse con las disoluciones extractantes empleadas en cada paso de extracción.
- Con cada lote de extractos, una muestra blanco (es decir un recipiente sin sedimento) será tratada con el procedimiento completo.

- El sedimento debe estar continuamente en suspensión durante la extracción. Si esto no ocurre, la velocidad de agitación debe adaptarse para asegurar una suspensión continua de la mezcla.

Más tarde, se propusieron algunas mejoras a este método de extracción secuencial y se hicieron una serie de recomendaciones acerca de las distintas variables identificadas como fuentes potenciales de incertidumbre [Rauret y col., 1999; Sahuquillo y col., 1999]. Una de las recomendaciones que se presentó fue la siguiente: como control interno del procedimiento, se recomienda que el residuo del paso 3º se digiera en agua regia y la cantidad total de metal extraída (suma de la fase 1 + fase 2 + fase 3 + residuo) se compare con el resultado de la digestión con agua regia de una muestra separada de 1 g del sedimento original. El residuo del paso 3º debe transferirse a un recipiente de digestión adecuado con aproximadamente 3 mL de agua y debe digerirse siguiendo el protocolo ISO-11466 [ISO, 1994]. El mismo procedimiento debe usarse para la digestión con agua regia del sedimento original.

A tenor de estos resultados Pueyo describe la preparación del material de referencia de sedimento BCR-701, preparada a partir de muestras de sedimento recogidas en el lago Orta en Italia [Pueyo y col., 2001]. En este trabajo se recogen todas las recomendaciones elaboradas en los trabajos precedentes, tanto para la aplicación del protocolo de extracción secuencial BCR como para la norma ISO-11466, presentándose los respectivos procedimientos.

Esta muestra de referencia ha sido extensamente utilizada en estudios de especiación metálica en sedimentos [The Coung y Obbard, 2006; Pueyo y col., 2008; Díaz-de Alba y col., 2011], pero un estudio reciente ha puntualizado que deberían existir adicionales materiales de referencia, con un rango más amplio de metales certificados, con el objetivo de abarcar una mayor variedad de suelos y sedimentos comúnmente analizados [Sutherland, 2010].

Como resultado del trabajo sistemático llevado a cabo por los integrantes del *Measurements and Testing Programme* el método de extracción secuencial en tres etapas, conocido como BCR, se ha ido estableciendo como método de referencia internacional, y será el que se aplique en esta tesis.

1.5. Legislación ambiental

La legislación ambiental o derecho ambiental es un complejo conjunto de tratados, convenios, estatutos, reglamentos y el derecho común que, de manera muy amplia, funciona para regular la interacción de la humanidad y el resto de los componentes

biofísicos o el medio ambiente natural, con la finalidad de reducir los impactos de la actividad humana, tanto en el medio natural como en la humanidad misma.

Existe un marco legislativo que viene dado desde la Unión Europea al que se deben adaptar todos los países miembros de la misma y que hace referencia a la calidad de las aguas y al uso que de ellas se hace.

La *Directiva 2000/60/CE, de 23 de octubre de 2000*, (DOCE núm. L327/1, de 22 de diciembre de 2000), también conocida como la Directiva marco del agua o DMA, es una norma del Parlamento Europeo y del Consejo de la Unión Europea por la que se establece un marco de actuación comunitario en el ámbito de la política de aguas. En España fue transpuesta al marco legislativo estatal a través del artículo 129 de la *Ley 62/2003, de 30 de diciembre de 2000, de Medidas Fiscales, Administrativas y del Orden Social*, que modificó el Texto Refundido de la Ley de Aguas (*Real Decreto Legislativo 1/2001, de 20 de Julio*, BOE núm. 176, de 24 de julio de 2001).

Esta Directiva considera en primer lugar que el agua no es un bien comercial, sino un patrimonio que hay que proteger, defender y tratar como tal y tiene como principal objetivo establecer un marco para la protección de las aguas continentales, las aguas de transición, las aguas costeras y las aguas subterráneas con los fines siguientes:

- La prevención del deterioro adicional y la protección y mejora del estado de los ecosistemas acuáticos, así como de los ecosistemas terrestres y humedales directamente dependientes de los ecosistemas acuáticos.
- La promoción de un uso sostenible del agua, basado en la protección a largo plazo de los recursos hídricos disponibles.
- La protección y mejora del medio acuático, mediante medidas específicas de reducción de vertidos y emisiones.
- La reducción de la contaminación de las aguas subterráneas.
- La paliación de los efectos de inundaciones y sequías.

Además, la DMA establece, como objetivo para el año 2015, conseguir un "buen estado" de las aguas europeas y que el "uso sostenible del agua" esté asegurado en toda Europa. Para alcanzar estas metas, la norma requiere la cooperación entre los distintos estados miembros, así como la participación de las entidades locales y ONGs en las actividades de gestión del agua. Además, reafirma el principio según el cual "el que contamina, paga". Asimismo, se contempla que las aguas de la Unión Europea están sometidas, desde hace años, a la creciente presión que supone el continuo crecimiento de la demanda de agua de buena calidad en cantidades suficientes para todos los usos,

definiéndose una serie de términos relacionados con las aguas y la contaminación acuática, de la siguiente forma:

- Aguas superficiales: se entiende como tal a las “aguas continentales (excepto las aguas subterráneas), las aguas de transición y las aguas costeras, y, en lo que se refiere al estado químico, también las aguas territoriales”.
- Aguas continentales: son “todas las aguas quietas o corrientes en la superficie del suelo y todas las aguas subterráneas situadas hacia tierra desde la línea que sirve de base para medir la anchura de las aguas territoriales”.
- Aguas de transición: son aquellas “masas de agua superficial próximas a la desembocadura de los ríos que son parcialmente salinas como consecuencia de su proximidad a las aguas costeras, pero que reciben una notable influencia de flujos de agua dulce”.
- Aguas costeras: son “las aguas superficiales situadas hacia tierra desde una línea cuya totalidad de puntos se encuentra a una distancia de una milla náutica mar adentro desde el punto más próximo de la línea de base que sirve para medir la anchura de las aguas territoriales y que se extienden, en su caso, hasta el límite exterior de las aguas de transición”.
- Cuenca hidrográfica: corresponde a la “superficie de terreno cuya escorrentía superficial fluye en su totalidad a través de una serie de corrientes, ríos y, eventualmente, lagos hacia el mar por una única desembocadura, estuario o delta”.
- Demarcación hidrográfica: “la zona marina y terrestre compuesta por una o varias cuencas hidrográficas vecinas y las aguas subterráneas y costeras asociadas”.
- Sustancias peligrosas: incluye a “las sustancias o grupos de sustancias que son tóxicas, persistentes y pueden causar bioacumulación, así como otras sustancias o grupos de sustancias que entrañan un nivel de riesgo análogo”.
- Contaminación: se define como “la introducción directa o indirecta, como consecuencia de la actividad humana, de sustancias o calor en la atmósfera, el agua o el suelo, que puedan ser perjudiciales para la salud humana o para la calidad de los ecosistemas acuáticos, o de los ecosistemas terrestres que dependen directamente de ecosistemas acuáticos, y que causen daños a los bienes materiales o deterioren o dificulten el disfrute y otros usos legítimos del medioambiente”.
- Contaminante: “cualquier sustancia que pueda causar contaminación, en particular las sustancias enumeradas en el anexo VIII de la Directiva Marco”.
- Sustancias prioritarias: son aquellas “sustancias que presentan un riesgo significativo para el medio acuático o a través de él”. Entre estas sustancias se encuentran las

sustancias peligrosas prioritarias que se establecen de acuerdo a la selección de sustancias de riesgo realizada en la legislación comunitaria pertinente relativa a sustancias peligrosas o en los acuerdos internacionales pertinentes.

En el anexo VIII de la Directiva se recoge el listado de los principales contaminantes, entre los que se encuentran los metales:

ANEXO VIII

LISTA INDICATIVA DE LOS PRINCIPALES CONTAMINANTES

1. *Compuestos organohalogenados y sustancias que puedan dar origen a compuestos de esta clase en el medio acuático.*
2. *Compuestos organofosforados.*
3. *Compuestos organoestánicos.*
4. *Sustancias y preparados, o productos derivados de ellos, cuyas propiedades cancerígenas, mutágenas o que puedan afectar a la tiroides, esteroideogénica, a la reproducción o a otras funciones endocrinas en el medio acuático o a través del medio acuático, estén demostradas.*
5. *Hidrocarburos persistentes y sustancias orgánicas tóxicas persistentes y bioacumulables.*
6. *Cianuros.*
7. *Metales y sus compuestos.*
8. *Arsénico y sus compuestos.*
9. *Biocidas y productos fitosanitarios.*
10. *Materias en suspensión.*
11. *Sustancias que contribuyen a la eutrofización (en particular nitratos y fosfatos).*
12. *Sustancias que ejercen una influencia desfavorable sobre el balance de oxígeno (y computables mediante parámetros tales como DBO o DQO).*

En la *Decisión 2445/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de noviembre de 2000* (DOCE núm. L331/1, de 15 de diciembre de 2001) se aprobó la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la Política de Aguas, que posteriormente fue modificada por la *Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008* (DOUE núm. L348/84, de 24 de diciembre de 2008), según la cual varios metales y sus compuestos (Cd, Pb, Hg y Ni y los derivados organometálicos del estaño) están incluidos dentro de las sustancias prioritarias, siendo Cd, Hg y los compuestos de tributilestaño considerados como sustancias prioritarias peligrosas. Además, en la *Comunicación de la Comisión sobre los resultados de la evaluación del riesgo y la estrategia de limitación de éste en relación con las sustancias siguientes: trióxido de cromo, dicromato de amonio y dicromato de potasio* (DOUE núm. C152/01, de 18 de junio de 2008), así como en la

Comunicación de la Comisión sobre los resultados de la evaluación del riesgo y la estrategia de limitación de éste en relación con las sustancias siguientes: cromato de sodio, dicromato de sodio y 2,2',6,6'-tetrabromo-4,4'-isopropilidendifenol (tetrabromobisfenol A) (DOUE núm. C152/11, de 18 de junio de 2008), se recomendó la inclusión de compuestos de Cr(VI) en la revisión de la lista de sustancias prioritarias con arreglo a la Directiva marco de aguas. Por el momento no se han tomado ningún tipo de decisiones al respecto.

En la *Decisión 2445/2001 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 20 de noviembre de 2000* también se recogen las estrategias para combatir la contaminación de las aguas. Por otro lado, se proponen guías para la evaluación del estado de las aguas superficiales por medio del empleo de indicadores de calidad biológicos (fitoplancton, macroalgas, angiospermas, fauna bentónica de invertebrados y fauna ictiológica), indicadores de calidad hidromorfológicos (mareas y condiciones morfológicas) e indicadores de calidad fisicoquímicos (condiciones generales, contaminantes sintéticos específicos y contaminantes no sintéticos específicos). Asimismo, también se especifican los procedimientos que deberán seguir los estados miembros para el establecimiento de las normas de calidad química, en las que se recoge la necesidad de desarrollar programas de monitorización periódica, tanto sobre las aguas y sedimentos como sobre la biota, entre la que se incluyen los peces. En este sentido, la *Directiva 2008/105/CE* establece las normas de calidad ambiental para las sustancias prioritarias y para otros contaminantes, con el objetivo de conseguir un buen estado químico de las aguas superficiales.

Como un paso más de la estrategia de protección de las aguas, se aprobó el *Real Decreto 60/2011, de 21 de enero, sobre las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas* (BOE núm. 19, de 22 de enero de 2011). Tal real decreto tiene como finalidad trasponer todos los aspectos contenidos en la *Directiva 2008/105/CE*, e incorpora al derecho español el apartado 1.2.6 del anexo V de la *Directiva 2000/60/CE*, en el cual se define el procedimiento para el establecimiento de normas de calidad ambiental (NCA) de contaminantes en aguas, sedimento o biota. En el citado real decreto se propone como objetivo

“establecer NCA para las sustancias prioritarias y para otros contaminantes de riesgo en el ámbito europeo; y para las sustancias preferentes de riesgo en el ámbito estatal. Asimismo, incorpora las especificaciones técnicas del análisis químico y del seguimiento del estado de las aguas, y fija el procedimiento para calcular las NCA de los contaminantes con objeto de conseguir un buen estado de las aguas”.

Con este nuevo real decreto, se actualiza la legislación española que recoge las normas de calidad ambiental de las sustancias preferentes, seleccionadas por presentar un riesgo significativo para las aguas superficiales españolas debido a su especial toxicidad,

persistencia y bioacumulación o por la importancia de su presencia en el medio acuático, y entre las que se encuentran el arsénico, el cobre, el cromo, el selenio y el cinc.

En conclusión, la aplicación práctica de la DMA supone un complejo reto para los estados miembros de la Unión Europea, siendo necesaria una aplicación coordinada y homogénea, de manera que los estados miembros y la Comisión Europea interpreten de la misma forma sus pautas y criterios. El mecanismo por el cual se intenta dar respuesta a estas necesidades mediante un procedimiento no vinculante es la Estrategia Común de Implantación, que se centra en cuatro actividades: intercambio de información, desarrollo de guías técnicas, información y gestión de datos, y aplicación, ensayo y validación.

Para garantizar el cumplimiento de la normativa a nivel de Andalucía, en enero de 2005 se constituyó la Agencia Andaluza del Agua, organismo autónomo de carácter administrativo de la Junta de Andalucía, adscrito a la Consejería de Medio Ambiente, competente en materia de aguas. Años más tarde, en enero de 2009, se aprobaron los estatutos de la Agencia Andaluza del Agua, en el *Decreto 2/2009, de 7 de enero* (BOJA núm. 6, de 12 de enero de 2009), comenzando a abordar en ese momento sus competencias. Según dicho Decreto, le corresponde a la Agencia el ejercicio de las competencias de la Comunidad Autónoma de Andalucía en materia de aguas y obras hidráulicas, y en particular:

- a) La elaboración, seguimiento y revisión de la planificación hidrológica, así como de los proyectos derivados de la misma.
- b) La administración, protección y control de los aprovechamientos hidráulicos y del dominio público hidráulico en general, incluyendo el otorgamiento de autorizaciones y concesiones.
- c) La planificación, programación, construcción, y en su caso, la explotación y mantenimiento de las obras hidráulicas de competencia de la Comunidad Autónoma de Andalucía.
- d) La planificación, ordenación y regulación de los servicios de abastecimiento de agua en alta y de saneamiento de las aguas residuales urbanas.
- e) La acción concertada y, si procede, la coordinación de las actuaciones de las Administraciones y entidades públicas competentes para mejora de la gestión de los servicios de abastecimiento de agua en alta y distribución de agua potable, y prevención de avenidas e inundaciones.
- f) El otorgamiento de concesiones y autorizaciones relativas al dominio público hidráulico, así como el censo de las mismas.

- g) La realización de trabajos de información y análisis como apoyo técnico a la formulación de la política de aguas de la Administración de la Junta de Andalucía y posterior evaluación de su aplicación.
- h) Los trabajos de elaboración y desarrollo de la información sobre la materia hidráulica, así como la difusión y divulgación de la misma.
- i) La colaboración en la investigación, desarrollo tecnológico e innovación en materia de aguas, con las administraciones y entidades públicas y privadas.
- j) La participación en las organizaciones nacionales e internacionales especializadas en gestión del agua, conservación de los recursos hídricos y tecnología hidráulica de conformidad con la normativa de aplicación.
- k) La gestión, recaudación y administración de los recursos económicos que correspondan a la Agencia.
- l) En general todas las funciones relativas a administración y gestión de las aguas de competencia de la Comunidad Autónoma, sin perjuicio de las atribuidas a otros órganos o entidades dependientes de la Administración de la Junta de Andalucía.
- m) Aquellas otras que le sean atribuidas legal o reglamentariamente y las que deriven de convenios que se suscriban con personas físicas o jurídicas, públicas o privadas.

La Agencia Andaluza del Agua desapareció en 2011, tras la reorganización del sector público realizada por la Junta de Andalucía, quedando integrada sus competencias en la Secretaría General de Medio Ambiente y Agua de la Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente de la Junta de Andalucía.

A las disposiciones legales anteriormente mencionadas, vigentes en la Comunidad Autónoma de Andalucía, hay que sumar otras correspondientes al Estado Español, como la convención de Barcelona que protege el mar Mediterráneo, así como otras leyes de la Unión Europea, tales como el convenio OSPAR, para la protección de las aguas del nordeste Atlántico, el convenio de Londres para la prevención de la contaminación marina por vertidos de residuos y otras materias, la convención sobre protección del río Danubio o la Comisión Internacional para la protección del Rin, demostrando así la enorme preocupación actual que existe por la fragilidad de este recurso, así como el interés por controlar y evitar su posible contaminación.

En 2010 entró en vigor la nueva *Ley 41/2010, de 29 de diciembre, de protección del medio marino* (BOE núm 317, de 30 de diciembre de 2010), que incorpora al derecho español la Directiva marco sobre Estrategia Marina (*Directiva 2008/56/CE*), suponiendo la mayor ampliación territorial del Derecho ambiental comunitario. Esta nueva Directiva, por la que se establece un marco de acción comunitario para la política del medio marino:

“introduce la obligación de lograr un buen estado ambiental de las aguas marinas europeas mediante la elaboración de estrategias marinas con el objetivo final de mantener la biodiversidad y preservar la diversidad y el dinamismo de unos océanos y mares que sean limpios, sanos y productivos, y cuyo aprovechamiento sea sostenible”.

“Hasta el momento se carecía de un marco normativo completo, que pudiera garantizar la articulación de las actividades humanas en el mar de manera que no se comprometiera la conservación de las características naturales de los ecosistemas marinos, de acuerdo con el enfoque ecosistémico”.

“La presente ley engloba la regulación de otros aspectos de la protección del medio marino que hasta ahora no se habían abordado en la legislación estatal. De esta manera, la Ley de Protección del Medio Marino se constituye como el marco general para la planificación del medio marino, con el objetivo de lograr su buen estado ambiental”.

“La Directiva marco sobre la estrategia marina establece que sus regulaciones se aplicarán a las aguas costeras con arreglo a la definición de la Directiva marco del agua, el lecho marino y el subsuelo situados más allá de la línea de base que sirve para medir la anchura de las aguas territoriales y que se extienden hasta el límite exterior de la zona en que un Estado miembro de la Unión Europea ejerce soberanía o jurisdicción de conformidad con la Convención de las Naciones Unidas sobre Derecho del Mar”.

El principal objetivo de la Directiva sobre Estrategia Marina es conseguir unas aguas marinas en un buen estado ecológico para 2020, lo que se logrará mediante el establecimiento de regiones y subregiones marinas, que gestionarán los Estados miembros de forma integrada basándose en criterios ecológicos.

Al elaborar las estrategias sobre las aguas de cada región marina, los Estados miembros deberán cooperar estrechamente. Cada estrategia consiste en un plan de acción que se aplicará en varias fases. Los Estados miembros deberán evaluar primero el estado ecológico de sus regiones marinas respectivas y las principales presiones que sufren las mismas, determinar después lo que se puede considerar un buen estado ecológico y establecer a continuación objetivos, indicadores y programas de seguimiento. Los programas de medidas deben elaborarse antes de 2015 para conseguir un buen estado ecológico para 2020.

Una contribución importante del Parlamento Europeo a la Directiva incluye la obligación de los Estados miembros de establecer zonas marinas protegidas. Los Estados miembros que compartan una región marina deberán cooperar para velar porque sus estrategias marinas sean coherentes y estén coordinadas. Deben también hacer todo lo posible para

coordinar sus actividades con países no pertenecientes a la UE en la misma región marina, incluso mediante convenios marinos regionales.

Capítulo 2

*Análisis por Extracción en Fase Sólida del
contenido de cobre en aguas naturales*

2

Análisis por Extracción en Fase Sólida del contenido de cobre en aguas naturales

Este capítulo se dedica a exponer una nueva metodología de preconcentración y análisis de Cu(II) en aguas naturales mediante extracción en fase sólida, utilizando discos de membrana previamente modificados con un ligando orgánico quelatante. Tomando como base la experiencia previa del Grupo de Investigación *Geoquímica Marina* en las propiedades analíticas de los ligandos de la familia de las aroilhidrazonas, se ha abordado el estudio de la aplicabilidad de la saliciloilhidrazona del piridoxal (PSH) en esta técnica de separación y preconcentración, con objeto de desarrollar un nuevo método de análisis de metales en aguas naturales, principalmente en agua de mar.

La saliciloilhidrazona del piridoxal es un reactivo orgánico que ha demostrado tener gran interés analítico. Se ha utilizado en la determinación espectrofotométrica y espectrofluorimétrica de varios metales tales como circonio, aluminio, titanio o cobre [Gallego y col., 1982b, 1983a y 1983b; Mohan y col., 1992]. También ha sido aplicado en voltamperometría de redisolución catódica adsortiva (AdCSV) para el análisis de níquel en agua de mar [Aouarram y col., 2010]. Sin embargo, y hasta el momento, no se ha estudiado su capacidad de complejación como reactivo en extracción en fase sólida. Esta técnica cuenta con la ventaja de que aísla el analito y elimina las posibles interferencias de matriz en muestras con propiedades desfavorables para el análisis directo, y su uso es novedoso en la preconcentración de trazas metálicas en muestras de aguas naturales.

Dado que la extracción en fase sólida presenta un gran número de variables químicas, físicas e instrumentales, parece muy adecuada la aplicación de métodos quimiométricos para el proceso de optimización.

2.1. El cobre en la naturaleza

Entre los metales más abundantes, de amplia distribución y que presentan toxicidad a ciertos niveles para los organismos acuáticos, se encuentra el cobre.

Este metal es un elemento que se encuentra a nivel de trazas en aguas naturales. La concentración de cobre en mar abierto se encuentra en el rango 0,0063 – 2,8 µg/L, con un valor medio de 0,05 µg/L; mientras que en aguas costeras, bahías y estuarios puede oscilar entre 0,069 – 20,0 µg/L. En sistemas fluviales estos niveles son algo superiores con valores entre 0,11 – 200 µg/L [Crompton, 2007]. Como es lógico, la cantidad de metal que puede ser medida en distintas zonas marinas, variará enormemente en función de la localización y el tipo de fuentes originarias. Así pues, se conocen por ejemplo las vías de ingreso y las cantidades globales para este metal, expresadas en toneladas/año que acceden al Mar del Norte, considerado como uno de los mares que sufren más directamente la contaminación de origen antropogénico [Crompton, 2007]:

- Ríos: 2600 toneladas al año.
- Atmósfera: 3942 toneladas al año.
- Vertidos directos: 276 toneladas al año.
- Dragados: 1469 toneladas al año.

Las precipitaciones atmosféricas contribuyen a la presencia de metales en mayor medida de la que se suponía, lo que hace que hoy se considere a la atmósfera como una importante vía de ingreso de metales, sobre todo en el mar. Los valores de transferencia de cobre desde la atmósfera a la superficie de agua marina (en ng/cm²/año) correspondientes al Mar del Norte, Mar Mediterráneo, Atlántico Sur y Pacífico Norte son respectivamente: 1300, 96, 220 y 9 [Díaz Mayans y col., 1993]. Existen grandes diferencias entre las distintas zonas marítimas y, a pesar de que no se conocen suficientemente las tasas de lluvia que condicionan estrechamente la deposición húmeda, tales diferencias se pueden imputar a la actividad industrial y urbana de distintas zonas.

El cobre es importante en el tratamiento de aguas, siendo eficaz en la lucha contra algas en depósitos de almacenamiento de aguas, lagos, embalses y piscinas. En distribución de aguas potables, debe tenerse en cuenta que las tuberías de este metal

pueden corroerse por el oxígeno del agua, la acidez de ésta, temperatura, procesos electroquímicos, etc. Finalmente, en concentraciones del orden de 3-5 mg/L puede aportar sabor amargo, coloración y turbidez al agua de consumo, así como provocar manchas en los sanitarios domésticos para niveles superiores a 1 mg/L. Industrialmente se emplea en la industria eléctrica y automovilística, construcción, fontanería, latón, y para la conservación de madera. Además, es un ingrediente esencial en algicidas y herbicidas [Jančula y Maršálek, 2011]. Las descargas más importantes al medio ambiente se producen por procesos de minería, fundición y recubrimiento de metales.

La utilización del cobre como elemento con propiedades terapéuticas se ha dado desde los primeros tiempos de la medicina. Debido a sus propiedades bioquímicas, fue utilizado por alquimistas hindúes, egipcios y sirios como terapia. En la actualidad, se sigue utilizando el cobre y sus complejos para sintetizar compuestos que actúen como agentes antiinflamatorios [Agotegaray y col., 2012], anticancerígenos [Vyas y col., 2012] y antituberculosos [Joseph y col., 2012]. Se ha demostrado que los complejos de cobre son efectivos en el tratamiento de cánceres dada su acción citotóxica sobre células tumorales. Alternativamente, estos complejos intervienen en la homeostasis de los niveles de cobre en el tejido cerebral, protegiendo al organismo de la neurodegeneración [Duncan y White, 2012].

El cobre es un elemento que se encuentra en todos los organismos como microcomponente. Es necesario para el metabolismo normal de muchos organismos vivos. Su presencia en animales y plantas se detectó hace 150 años. Además, es un micronutriente esencial, necesario para las plantas a niveles muy bajos. Asimismo, es un oligoelemento esencial para el hombre, estando involucrado en la formación de hemoglobina, junto al Co, y en la de los eritrocitos, que a su vez intervienen en el desarrollo de los sistemas óseos y nervioso central. También, se encuentra combinado con algunas proteínas del plasma sanguíneo y dentro de ciertas enzimas. La esencialidad del Cu se manifiesta en que actúa como un grupo prostético de numerosas enzimas y puede servir como cofactor para la activación enzimática, sobre todo de las enzimas asociadas con el metabolismo oxidativo, como la citocromo c oxidasa [Kim y col., 2012]. Puesto que el cobre es un metal que puede existir tanto en su forma oxidada como en la reducida, se ha demostrado que participa en reacciones redox y catalíticas, actuando como cofactor de una gran variedad de enzimas y moléculas [Duncan y White, 2012].

La mayoría de los datos demuestran que su deficiencia es mucho más crucial para los animales que las situaciones tóxicas. Sin embargo, hay suficiente evidencia para soportar la hipótesis de que la sobreexposición puede dar lugar a efectos negativos para la salud humana. A valores altos resulta tóxico debido a su unión con la membrana celular, que impide el transporte a través de la pared de la célula [Safavi y col., 2001]. Se ha detectado que la exposición a este metal afecta negativamente a la glucólisis [Carvalho y Fernandes,

2008], el ciclo de Krebs [Couture y Kumar, 2003], la regulación osmótica e iónica [Pinho y col., 2007], el consumo de oxígeno y al crecimiento [Manyin y Rowe, 2009], entre otros. La mayoría de estos efectos pueden estar asociados directa o indirectamente con una producción de energía insuficiente para mantener el metabolismo celular y la homeostasis. En condiciones extremas, puede acabar en muerte del organismo [Lauer y col., 2012].

En los sistemas acuáticos se ha observado que la toxicidad del Cu aumenta cuando disminuye la dureza del agua y el oxígeno disuelto, decrece en presencia de agentes quelatantes, ácidos húmicos, aminoácidos y sólidos en suspensión esenciales para atrapar metales [Armendáriz Sáenz y col., 2008]. En peces se han descrito lesiones morfológicas en los órganos sensoriales inducidas por Cu, como por ejemplo desintegración celular en las papilas gustativas de peces de colores, así como lesiones en los órganos olfativos. También se observan cambios en las córneas lo que sugiere un trastorno del sistema visual. Además, este metal afecta a la actividad colinesterasa de los peces en el cerebro y músculo, disminuyendo su actividad y provocando un aumento en el contenido de acetilcolina en las terminaciones nerviosas interrumpiendo la transmisión del impulso nervioso. Otros efectos negativos debido a un exceso de cobre son el estrés oxidativo y efectos nocivos sobre los órganos osmoregulatorios, branquias, como por ejemplo la inhibición del transporte de iones sodio debido a la inhibición de la enzima Na^+/K^+ -ATPasa en peces y la inhibición de la anhidrasa carbónica en los crustáceos [Grosell y col., 2004].

Dada la importancia del cobre en el medio ambiente y en los organismos, este capítulo se centra en la preconcentración y determinación de este metal en aguas naturales para su aplicación en el control de la contaminación.

2.2. Extracción en fase sólida aplicada al análisis de metales pesados en aguas

El análisis de trazas de metales en muestras de aguas naturales presenta importantes exigencias durante los procedimientos de muestreo, conservación, pretratamiento y metodología, puesto que la mayoría de estas especies se encuentran a niveles muy bajos en este tipo de muestras ($\mu\text{g/L}$ o ng/L). Por lo tanto, se requieren métodos analíticos de elevada sensibilidad y selectividad, así como procedimientos de manipulación "limpios" de las muestras, que son muy fáciles de contaminar. La espectroscopía de absorción atómica con llama (FAAS) o con horno de grafito (GFAAS) se utiliza con frecuencia en la determinación de metales pesados. Sin embargo, su sensibilidad puede ser insuficiente cuando se trata de subtrazas metálicas en algunas muestras ambientales [Yaman, 2005; Mirzaei y col., 2011; Tobiasz y col., 2012]. Por su parte, la técnica de espectrometría de

masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) también proporciona una mayor sensibilidad en el análisis de metales pesados. Sin embargo el alto coste del equipo así como los gastos de funcionamiento son una carga económica bastante grande para un laboratorio corriente [Peng y col., 2007].

La aplicabilidad de este tipo de técnicas, sobre todo FAAS o GFAAS, se ve reducida cuando la matriz es muy compleja. Como consecuencia, se suele utilizar como paso previo al análisis la preconcentración del analito y la eliminación de la matriz. Por ello, las técnicas de separación y preconcentración se convierten en piezas claves en este tipo de metodologías.

Las técnicas de separación abarcan un amplio espectro que se extiende desde los simples procesos de precipitación, destilación, extracción,... hasta las más avanzadas técnicas cromatográficas. Todas ellas se basan en diferentes fundamentos físico-químicos, pero tienen en común la transferencia de masa que se realiza entre, al menos, dos fases distintas. De esta manera, se consigue alcanzar una mayor selectividad en la separación y sensibilidad en la determinación.

La extracción en fase sólida (*Solid-Phase Extraction: SPE*) constituye una técnica de preconcentración ampliamente utilizada para el aislamiento de determinados analitos y la simplificación de la matriz en muestras con propiedades desfavorables para el análisis directo. La extracción suele llevarse a cabo utilizando un lecho adsorbente particulado situado dentro de columnas de pequeña longitud (usualmente llamados "cartuchos") o bien inmovilizado en forma de disco. En ambas configuraciones, el analito se transfiere desde una fase móvil (gas o líquido) a una fase sólida, donde quedará retenido. Posteriormente el analito se recupera mediante elución de un líquido o mediante desorción térmica en el caso de que la fase móvil sea un gas [Poole, 2003].

Recientemente, la extracción en fase sólida ha sido muy utilizada como técnica en el pretratamiento de muestras para análisis de trazas metálicas. En este caso, los principales objetivos de la SPE suelen ser la preconcentración de metales, la simplificación de la matriz de la muestra y el intercambio de medio o transferencia del analito desde la matriz de la muestra a un disolvente diferente o a una fase gaseosa.

Esta técnica de preconcentración se desarrolló inicialmente como complemento a la extracción líquido-líquido. Hoy en día es la técnica más comunmente utilizada en diversas áreas de la Química, como pueden ser la ambiental, farmacéutica, clínica, alimentación e industria [Poole, 2003]. La extracción líquido-líquido convencional es muy laboriosa, difícil de automatizar y presenta serios problemas, como la formación de emulsiones. Además, consume grandes volúmenes de disolventes de alta pureza y, por tanto, requiere una disposición económica bastante alta. En contraposición a esta técnica, la extracción en fase sólida requiere unos costes menores, tiempos de análisis más cortos, evita la formación de

emulsiones y no requiere de instrumentación costosa [Armenta, 2008; Das y col., 2012]. Además, se considera una técnica amistosa con el medio ambiente y se engloba dentro de la *Química Analítica Verde*, puesto que evita el empleo de grandes volúmenes de disolventes orgánicos que producen un gran impacto medioambiental [de la Guardia y Armenta, 2011].

2.2.1. Fundamento de la SPE

El principio en el que está basado la SPE es similar al de la extracción líquido-líquido (LLE). Ambos procedimientos incluyen una transferencia de solutos entre dos fases. La diferencia radica en que en LLE la distribución selectiva del analito se produce entre dos fases líquidas inmiscibles, mientras que en SPE, se produce entre una fase líquida (donde está contenido el analito de interés) y una fase sólida (que será el adsorbente). Este tratamiento de la muestra proporciona una preconcentración y una purificación del analito contenido en la muestra, mediante su adsorción en un material sólido [Camel, 2003].

Generalmente, la SPE consta de 3 etapas fundamentales. La primera de ellas consiste en la preparación y acondicionamiento del material adsorbente, haciendo uso de disolventes orgánicos y ácidos con el fin de eliminar posibles impurezas contenidas inicialmente en el soporte sólido. La segunda etapa consiste en hacer pasar la muestra a través de dicho soporte, con la subsiguiente preconcentración del analito. Así, es fundamental que el analito que se va a extraer tenga una mayor afinidad por la fase sólida que por la matriz de la muestra. Tras esta etapa de extracción, es recomendable realizar una etapa de secado, especialmente cuando se desea la eliminación de la matriz acuosa, eliminando los restos de agua del adsorbente sólido. La última etapa sería la desorción del analito y su elución mediante el uso de un disolvente apropiado. Una vez que el analito se haya eluido, su concentración será determinada con alguna técnica analítica de medida [Camel, 2003; Buszewski, 2012].

Como conclusión, se puede definir la SPE como una técnica de preconcentración de analitos, mediante la retención en una fase sólida y su posterior elución con un disolvente apropiado.

2.2.2. Tipos de formato

La preconcentración de muestras líquidas mediante SPE comenzó a desarrollarse ampliamente en los laboratorios a partir de 1980, con la introducción de columnas de sílice. Posteriormente, en 1989, se introdujo la tecnología de discos, que actualmente compite con la anterior [Poole, 2000]. Las columnas con diámetros internos reducidos limitan la velocidad de flujo a 1-10 mL/min, con lo cual se requieren tiempos bastante amplios para

la preconcentración de muestras de grandes volúmenes. Además, las muestras con materia particulada pueden obstruir el cartucho y producir canalizaciones preferentes por las que eluya el analito [Yamini y Tamaddon, 1999]. Los discos fueron desarrollados en un principio para prevenir estos problemas y proporcionar mayores velocidades de proceso cuando se utilizaban volúmenes grandes de muestra. Además minimizaban la existencia e interferencias de partículas suspendidas y otros componentes de la matriz [Lingeman y Hoekstra-Oussoren, 1997; Thurman y Snavely, 2001; Fritz y Masso, 2001].

En general, los discos para la extracción en fase sólida pueden utilizarse como tales en aparatos de filtración para volúmenes grandes de muestras o bien formando parte de jeringuillas y columnas para la extracción de muestras de medio y pequeño volumen [General Guidelines for Empore Extractions Disks and Cartridges]. Los tipos de formatos que existen se detallan en la Figura 2.1.

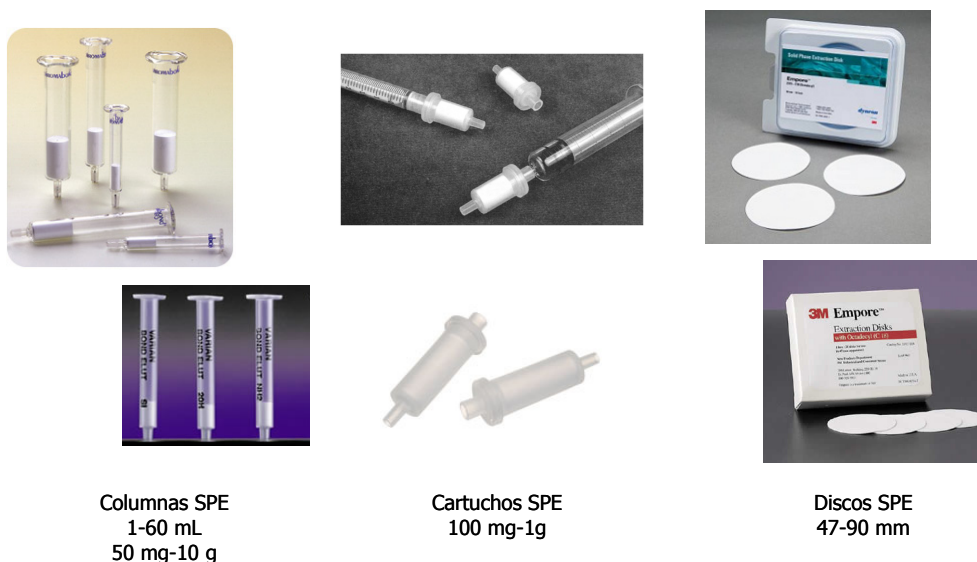


Figura 2.1. Diferentes formatos utilizados en extracción en fase sólida

A pesar de que cuentan con una tecnología similar, existen varias diferencias entre las columnas y los discos que se pueden resumir de la siguiente manera [Poole, 2003]:

- Las columnas pueden prepararse fácilmente en el laboratorio, mientras que los discos únicamente se fabrican de forma industrial. Por lo tanto, los discos solo están disponibles en un limitado número de adsorbentes y son menos económicos que las columnas.

- Por el contrario, los discos ofrecen ciertas ventajas que favorecen su uso, tales como su aplicación en muestras de gran volumen que contengan material particulado en suspensión, donde los discos funcionan mejor que las columnas ya que evitan que se produzcan obstrucciones y canalizaciones preferentes. Además, proporcionan tiempos de proceso más cortos debido al mayor entrecruzamiento entre sus fibras. Esto es importante en programas de monitorización medioambiental, como por ejemplo, en el análisis de sustancias tóxicas o persistentes en aguas naturales que contienen frecuentemente una gran cantidad de materia particulada.
- Los discos proporcionan una gran superficie de retención, lo que facilita su uso en los muestreos pasivos, en los que se sumerge el disco en la muestra, en lugar de pasar ésta a través del disco. Esta técnica puede utilizarse tanto en aplicaciones de campo como en el laboratorio, aunque a veces puede ser difícil su aplicación debido a los problemas que pueden producirse si el equilibrio de partición no se alcanza adecuadamente, incluso en muestras con agitación.
- En la configuración de columna, debido al bajo empaquetamiento que existe, se debe utilizar más cantidad de adsorbente para evitar la retención del analito por obstrucción o por producción de canalizaciones. El incremento en la masa de adsorbente produce una disminución en la especificidad de absorción y genera extractos más sucios.
- Los discos contienen más partículas y caminos más tortuosos, lo que implica que exista una mayor superficie disponible y la cinética de adsorción es mucho más rápida que en los cartuchos. Esta diferencia de tamaño de partícula en los discos y en columnas se muestra en la Figura 2.2.

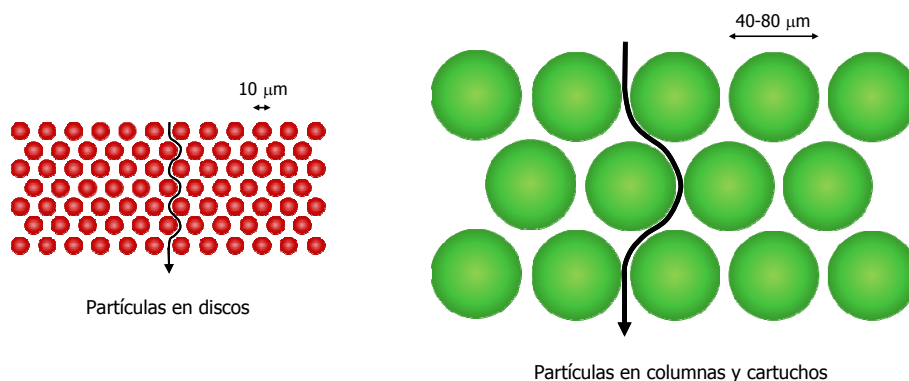


Figura 2.2. Diferencia en el tamaño de las partículas de discos y columnas utilizados en SPE [Thurman, 2000]

Además, en la bibliografía se detallan diversas investigaciones sobre extracción en fase sólida en las que se comparan los resultados obtenidos en análisis con discos y columnas para muestras de aguas naturales [Björklund y Morrison, 1997]. En estos estudios, se llega a la conclusión de que se obtienen peores blancos utilizando columnas en lugar de discos, puesto que la materia orgánica de la muestra es capaz de adsorberse en las paredes y eluirse posteriormente, pudiendo ser un interferente durante el análisis.

Hoy en día los discos para SPE están disponibles en diferentes tamaños y composición. Existen membranas formadas por partículas de 8 a 12 μm de diámetro, que actúan como adsorbentes y que se encuentran inmovilizadas en una malla de fibras constituidas por poli(tetrafluoroetileno) (PTFE). Estas fibras se preparan en discos de 0,5 mm de espesor y con diámetros de 4 a 96 mm. El 90% del peso de estos discos es el adsorbente. Estas membranas también están disponibles en cartuchos, en cuyo caso el lecho de material adsorbente está constituido por partículas de un tamaño aproximado de 50 μm colocadas en un disco de 1 mm de grosor, que se encuentra en la base de una jeringuilla. La superficie superior de estos discos está formada por polipropileno, que produce una prefiltración de la muestra antes de que ésta llegue al interior del disco [Poole, 2003].

2.2.3 Tipos de adsorbentes y selección adecuada de discos

A la hora de seleccionar un tipo de adsorbente para una determinada aplicación, los parámetros de interés, además de su naturaleza, son el tamaño del disco, la capacidad de adsorción y la cantidad de muestra que es capaz de soportar antes de que se sature. Los discos de gran diámetro son utilizados para volúmenes de muestras grandes con el fin de mejorar el paso de la muestra a través del disco. Aquéllos que tienen un diámetro menor se utilizan para muestras de pequeños volúmenes y para recuperar analitos que se encuentran disueltos en pequeñas cantidades de disolventes. En general, los diámetros pequeños se usan frecuentemente en análisis clínicos, forenses y farmacéuticos, mientras que los diámetros mayores se utilizan en análisis medioambientales. Además, los discos pequeños se han utilizado recientemente en análisis de metales pesados por extracción en fase sólida colorimétrica, en los que la última etapa de elución no se lleva a cabo, sino que el procedimiento de medida se realiza determinando la cantidad de analito directamente sobre la superficie del sólido empleando algún tipo de sensor óptico de colorimetría, fluorescencia o reflectancia difusa [Espada Bellido, 2010].

Los mismos adsorbentes que se manejan convencionalmente en la extracción en fase sólida en columna son los que se usan para extracción con discos. Los adsorbentes más comunes en SPE incluyen los de sílice (C_2 , C_8 , C_{18}), los de carbono y los poliméricos (principalmente los de poliestireno divinilbenceno) [Fontanals y col., 2007].

Los adsorbentes sólidos para SPE pueden ser hidrofóbicos (no polares) o hidrofílicos (polares). Debe prestarse atención a la naturaleza y las propiedades de un adsorbente, ya que de ello va a depender el porcentaje o efectividad en la retención del analito. Los requisitos principales que se buscan a la hora de seleccionar el adsorbente son [Camel, 2003]:

- La posibilidad de extraer gran número de elementos traza en un amplio rango de pH.
- Una adsorción y elución rápidas y cuantitativas.
- Alta capacidad de retención.
- Regenerabilidad.
- Accesibilidad.

La gran variedad de adsorbentes disponibles explica uno de los aspectos más importantes de la SPE: su selectividad. Los adsorbentes pueden clasificarse, según su naturaleza, como inorgánicos (sílice SiO_2 , alúmina Al_2O_3 , magnesia MgO y otros óxidos) y como orgánicos (polímeros tanto naturales como sintéticos) [Camel, 2003]:

(a) Adsorbentes de naturaleza inorgánica

El principal adsorbente dentro de este grupo está basado en el empleo de gel de sílice SiO_2 , presentando estabilidad mecánica, térmica y química bajo determinadas condiciones.

- *Gel de sílice*: Los agentes quelatantes pueden ser fácilmente inmovilizados sobre este tipo de material caracterizado por una elevada estabilidad y por la presencia de grupos silanol. Sin embargo, este adsorbente posee una baja selectividad además de sufrir hidrólisis a pH básicos. La presencia de grupos silanol residuales puede tener una influencia negativa en la separación de analitos polares [Buszewski y Szultka, 2012]. Por ello, normalmente se modifica la superficie del gel de sílice con el fin de conseguir adsorbentes sólidos más selectivos. En tal caso, por un lado se puede realizar una inmovilización química, donde se forma un enlace entre los grupos de la superficie del gel de sílice y los de un compuesto orgánico (adsorbentes funcionalizados), y por otro lado una inmovilización física donde el compuesto orgánico es directamente adsorbido sobre los grupos silanol de la superficie del gel de sílice (adsorbente impregnado) [Camel, 2003].
- *Octadecil-sílica ($\text{SiO}_2\text{-C}_{18}$)*: Octadecil-sílica se ha convertido en el adsorbente de sílice más popular. Los grupos alquilo están enlazados covalentemente a los grupos silanol de la superficie de la sílice [Cámara, 2002]. Este tipo de adsorbente modificado por los adecuados ligandos, ha sido empleado de manera satisfactoria en la determinación de iones metálicos. A pesar de su amplio abanico de aplicaciones en la preconcentración de trazas metálicas, los adsorbentes basados en sílice presentan

carácter hidrofóbico, por lo que, en la práctica, no funcionan muy bien en la retención de especies de elementos traza puesto que la mayoría son polares o iónicos.

- Otros óxidos inorgánicos: TiO_2 (titania), Al_2O_3 (alúmina), ZrO_2 (zirconia) y MgO (magnesia).

(b) Adsorbentes de naturaleza orgánica

Este grupo puede ser dividido en adsorbentes de tipo polimérico y no polimérico. El material polimérico tiene la ventaja frente a los soportes de tipo sílice, antes comentados, de que puede trabajar a lo largo de toda la escala de pH. Es de destacar también la creación de nuevos materiales mediante la formación de enlaces químicos entre grupos adicionales y las cadenas de polímero.

- *Adsorbentes basados en poliestireno-divinilbenceno*: Amberlita XAD-1, XAD-2, XAD-4 y XAD-16 son resinas de poliestireno-divinilbenceno (SDB) con cierto carácter hidrofóbico y sin capacidad de intercambio iónico. Este tipo de material permite las interacciones de tipo $\pi-\pi$ con anillos aromáticos. Debido al carácter hidrofóbico de estos materiales de SDB, la retención de elementos traza requiere de la adición de ligandos a la muestra. Aunque se pueden emplear ligandos de tipo inorgánico, se prefiere el empleo de ligandos orgánicos [Camel, 2003; Fontanals y col., 2007]. La ausencia de grupos silanol produce menores interacciones secundarias durante el proceso de extracción, y su amplio margen de estabilidad a todos los pH incrementa la flexibilidad del método y su aplicación [Buszewski y Szultka, 2012].

Aunque los adsorbentes basados en poliestireno divinilbenceno son probablemente los más empleados, también han sido usados otros materiales de manera satisfactoria, entre los que se encuentran:

- *Copolímeros de divinilbenceno-vinilpirrolidina.*
- *Polímeros de poliacrilato: Amberlita XAD-7 y XAD-8.*
- *Polímeros de poliuretano.*
- *Polímeros de polietileno.*
- *Polímeros de politetrafluoroetileno.*
- *Polímeros de poliestireno.*
- *Polímeros de poliamida.*
- *Resinas quelatantes de tipo iminodiacetato.*
- *Resinas quelatantes de tipo propilenodiaminotetraacetato.*

- *Resinas basadas en poliacrilonitrilo.*
- *Polímeros basados en la polimerización metatésica por apertura de anillos.*
- *Adsorbentes de carbono.*
- *Celulosa.*
- *Adsorbentes basados en naftaleno.*

Existe una metodología algo más compleja que se basa en apilar discos que contengan distintos adsorbentes con el objetivo de recuperar, en una única elución, varios analitos. De este modo, se pueden extraer muestras complejas que contengan compuestos de diferente polaridad o capacidad de ionización, a la vez que se reducen las interferencias debido a que en uno de los discos se producirá la adsorción selectiva de la matriz y en otro, la adsorción del analito.

En la Tabla 2.1 se recogen los adsorbentes más utilizados y las aplicaciones descritas en la bibliografía.

Tabla 2.1. *Tipos de adsorbentes y aplicaciones [Poole, 2000]*

Adsorbente	Aplicaciones generales
Octadecil sílice (C ₁₈) y octil sílice (C ₈)	C ₁₈ es un adsorbente no específico (y por tanto, su uso es más amplio que el de C ₈). Se utiliza en la extracción de pesticidas, herbicidas, aditivos, compuestos farmacéuticos, hidrocarburos, etc., todos ellos no polares.
Poliestireno divinilbenceno (SDB)	Se utiliza para compuestos que no pueden extraerse en C ₁₈ por su alta solubilidad en agua: pesticidas y herbicidas polares, fenoles y compuestos farmacéuticos polares. Si los polímeros se encuentran sulfonados, acetilados o hidroximetilados, proporciona una alta recuperación de compuestos polares neutros.
Carbón activo	Sus aplicaciones son similares a las de poli-estireno divinilbenceno pero su uso es menos frecuente. Puede extraer herbicidas triazinas, algunos pesticidas polares y N-nitroso-dialquilaminas.
Adsorbentes mixtos	El adsorbente octadecil sílice enlazado a grupos de ácido bencenosulfónico se utiliza en toxicología para el aislamiento de drogas y sus metabolitos, como por ejemplo los derivados de marihuana y cocaína, anfetaminas y opiáceos en fluidos biológicos.

Tabla 2.1 (cont.). Tipos de adsorbentes y aplicaciones [Poole, 2000]

Adsorbente	Aplicaciones generales
Iones intercambiadores (ácido sulfónico y aminas cuaternarias)	Extraen herbicidas ácidos y pesticidas en agua, así como drogas básicas en fluidos biológicos.
Éteres corona	Aíslan metales preciosos (Pd, Pt, Rh) y radionúcleos (Cs, Sr, Pb). También recuperan impurezas metálicas (Bi, Sb, Fe, Pb, Bi, Cu, Hg) de vertidos de refinerías.

Para la extracción de metales pesados en aguas naturales se suelen utilizar los discos de C_{18} y de poliestireno divinilbenceno (Figura 2.3). Actualmente, algunos de estos discos, especialmente los de C_{18} , se están comenzando a utilizar con éxito para la separación y determinación de iones metálicos tanto en suelos como en aguas naturales y potables.

Algunos metales, como hierro, níquel y cobre han sido analizados mediante SPE y determinación por espectroscopía de absorción atómica con llama [Mashhadizadeh y col., 2008a y 2008b; Karve y Rajgor, 2009; Fathi y Yaftian, 2009]. Níquel y plata también han sido determinados en aguas naturales mediante SPE y espectroscopía de reflectancia difusa [Gazda y col., 2004; Hill y col., 2010].

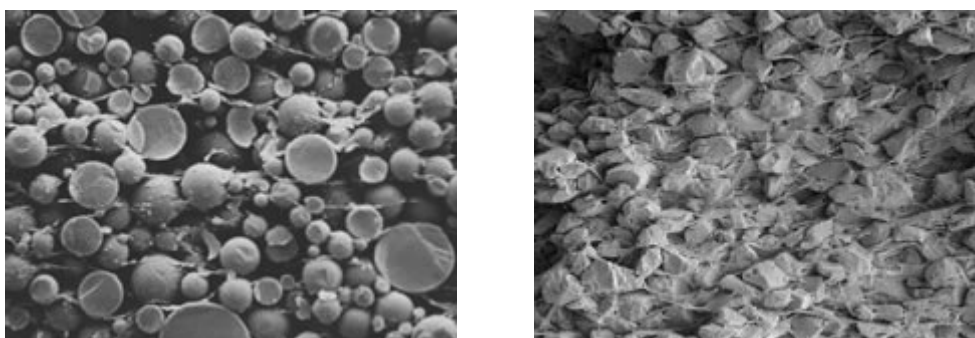


Figura 2.3. Estructura a nivel microscópico del poliestireno-divinilbenceno (izquierda) y octadecil sílice (derecha) [http://solutions.3m.com/wps/portal/3M/en_US/Empore/extraction/center/technology/]

A pesar, de su amplio abanico de aplicaciones en la preconcentración de trazas metálicas, los adsorbentes basados en sílice (octadecil-sílica o gel de sílice funcionalizada) presentan un rango de pH limitado, ya que a valores de pH muy ácidos (por debajo de pH

2) y a pH muy básicos (por encima de pH 10) se produce la hidrólisis del material. Además, presentan una baja capacidad de carga [Pyrzynska, 2012].

En resumen, con los discos C_{18} pueden realizarse principalmente extracciones no polares, mientras que con los discos de SDB se pueden llevar a cabo extracciones de polaridad moderada. Los materiales de sílice se caracterizan por un mayor consumo de disolventes y de tiempo, así como por una baja capacidad de carga y un rango de pH limitado. Además, en algunos casos, los procesos pueden ser irreversibles y pueden provocar la degradación de ciertos analitos [Culleré y col., 2003]. En contraposición, los polímeros de SDB presentan una capacidad de carga mucho mayor, son más estables frente a pH extremos y no presentan interacciones catiónicas secundarias debidas a los grupos silanol [Buszewski y Szultka, 2012]. Como consecuencia, se prefieren los adsorbentes poliméricos, como el poliestireno divinilbenceno.

En la Tabla 2.2 se muestran las principales características para las fases sólidas más utilizadas.

Tabla 2.2. Comparación de características de las fases sólidas típicas de sílice y copolímeros (<http://solutions.3m.com>)

	Sílice	Copolímero
Rango de pH	2 a 12	1 a 14
% Materia orgánica	< 22%*	100%
Interacciones secundarias	Sí	No
Funcionalidad	Alifática	Aromática y alifática
Tamaño de partícula	Irregular	Esférica
Tamaño de poro	60 Å	80 Å

* varía desde 6% a 22% de carbono, dependiendo del grupo funcional

Por todo lo anteriormente comentado, la metodología por la que se ha optado para la preconcentración de Cu(II) en aguas naturales y su posterior determinación es, por tanto, la Extracción en Fase Sólida (SPE), utilizando discos de membrana SDB, y la Espectroscopía de Absorción Atómica con llama como sistema de detección.

2.3. Determinación de metales pesados en aguas naturales por extracción en fase sólida SPE

El uso de discos de membrana para la extracción en fase sólida constituye una alternativa eficaz para la separación y concentración de iones metálicos en muestras acuosas medioambientales. En concreto, resulta especialmente válida para su aplicación en aguas naturales de naturaleza salina, ya que por su diseño permiten eliminar el efecto de matriz que suele interferir en el análisis de metales. Las aguas con un alto contenido en sales disueltas son muestras en las que los métodos clásicos de análisis pueden ofrecer ciertas dificultades. Las altas concentraciones de metales alcalinos (Na^+ , K^+), alcalinotérreos (Mg^{2+} , Ca^{2+}) y halogenuros (Cl^-) pueden ser fuentes de interferencias físicas y químicas que afectan a la precisión de las medidas, así como al funcionamiento de los instrumentos analíticos empleados para realizar las mediciones [Crompton, 2007]. Además, los niveles extremadamente bajos de los metales traza que presenta el agua de mar, hace difícil o imposible la determinación directa de estos metales por la mayoría de los instrumentos analíticos convencionales [Strickland y Parsons, 1977]. Por este motivo, se han desarrollado una gran variedad de métodos de preconcentración y separación con el fin de aumentar la concentración de los metales traza y separarlos de la matriz salina en la que se encuentran presentes. En la Tabla 2.3, se recogen las aplicaciones analíticas de la extracción en fase sólida para la determinación de metales en muestras reales de agua de mar desarrolladas durante los años 2005-2012.

Tabla 2.3. Resumen de los métodos de preconcentración de metales traza en agua de mar mediante extracción en fase sólida desarrollados durante los años 2005-2012

Metal	Procedimiento	Detección ^a	Referencia
Cd, Co, Cu, Mn, Pb, Zn	SPE en microcolumna empaquetada con 6-[(4-hidroxifenil)diazenil]naftalen-2,3-diol-formaldehído	FAAS	Mannivanan y Biju, 2012
Cd, Cu	SPE en minicolumna de sílice coloidal modificada con difenilcarbácida	FAAS	Bagheri y col., 2012
Au, Pd, Pt	SPE en columna de gel de sílice modificada con cisteína	GFAAS o ICP-AES	Mladenova y col., 2012
Zn	SPE con polímeros de impresión iónica	FAAS	Shakerian y col., 2012

Tabla 2.3 (cont.). Resumen de los métodos de preconcentración de metales traza en agua de mar mediante extracción en fase sólida desarrollados durante los años 2005-2012

Metal	Procedimiento	Detección ^a	Referencia
Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn	SPE en minicolumna empaquetada con 1,5-bis(2-piridil)-3-sulfofenil-metilen-tiocarbono-hidracida	FI-ICP-MS	Sánchez-Trujillo y col., 2012
Al, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Sn, Zn	SPE en cartuchos de C ₁₈	ICP-AES	Otero-Romaní y col., 2011
Pb	SPE en cartucho relleno con Amberlita XAD-2 modificada con ácido salicílico e iminodiacético	FAAS	Panahi y col., 2011
Pb	SPE en minicolumna rellena con resina Lewatit Monoplus TP207	FI-GFAAS	Sahan y Sahin, 2011
Cd, Cu, Pb, Zn	SPE en minicolumna empaquetada con alúmina modificada con nanopartículas de sulfuro	FAAS	Ghanemi y col., 2011
Cd, Pb	SPE con microcolumna empaquetada con alúmina modificada con sodio dodecilsulfato 1-(2-piridilazo)-2-naftol (SDS-PAN)	FAAS	Ezoddin y col., 2010
Zn	SPE en minicolumna rellena de etilvinilacetato (EVA)	ICP-AES	Escudero y col., 2010
Cr(III), Fe, Pb	SPE con carbón activado modificado con trietilenotetramina (ACTETA)	ICP-AES	Zhang y col., 2010
Cr(III), Cu, Ni	Preconcentración en columna de Diaion SP-850 modificada con bis(2-hidroxiacetofenona)-1,2-propanodiimina (BHAPPDI)	FAAS	Shokrolahi y col., 2010
Pb	Preconcentración en alúmina modificada con ditizona	AAS	Mahmoud y col., 2010
Cu	Preconcentración en gel de sílice modificado con 4-amino-2-mercaptopirimidina (AMP)	FAAS	Pereira y col., 2010
Cu, Pb	Complejación con 1-2-piridoxal-2-naftol (PAN) y preconcentración en membranas de acetato	FAAS	Soylak y col., 2010
Co, Cu, Fe, Mn, Ni	SPE con resina quelatante iminodiacética	ICP-AES	Moreton y col., 2009

Tabla 2.3 (cont.). Resumen de los métodos de preconcentración de metales traza en agua de mar mediante extracción en fase sólida desarrollados durante los años 2005-2012

Metal	Procedimiento	Detección ^a	Referencia
Cu	Complejación de Cu(II) con cromazurol S (CAS) y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), y posterior adsorción en una minicolumna empaquetada de algodón	ICP-AES	Faraji y col., 2009
Cd, Co, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, U, V, Zn	SPE empleando disco quelatante	ICP-MS	Itoh y col., 2009
Cd, Cu, Pb, Ni	Adsorción en una columna de clinoptilolita impregnada con 1-(2-piridilazo)-2-naftol (PAN)	FAAS	Faghihian y col., 2009
Hg	Preconcentración en baño empleando un polímero de impronta iónico	CV-AAS	Dakova y col., 2009
Mo	Preconcentración en una resina quelatante de TSK-8HQ	MC-ICP-MS	Nakagawa y col., 2008
Cu, Cd, Co, Ni, Pb, Zn	SPE de quelatos metálicos formados con pirrolidín ditiocarbamato amónico (APDC) sobre nanotubos de carbono	FAAS	Tuzen y col., 2008
Cr(III) Cr(VI)	Preconcentración mediante alúmina modificada con isatin-tiosemicarbazona	UV-VIS	Mahmoud y col., 2008a
Cd, Cu, Hg, Pb	SPE sobre sílice cubierta con nanopartículas magnéticas modificadas con γ -mercaptopropil trimetoxisilano	ICP-MS	Huang y Hu, 2008
Cu y Ni	SPE con gel de sílice modificado con tetraamina de trietileno	FAAS	Imamoglu y Gunes, 2008
Cr(III) Cr(VI)	SPE con alúmina modificada con tiosemicarbazida	UV-VIS	Mahmoud y col., 2008b
Al, Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Zn	Preconcentración empleando una resina quelatante de ácido etilendiaminotriacético	ICP-MS	Sohrin y col., 2008
Cd, Co, Cr, Mn, Ni, Pb	Preconcentración sobre Chromosorb 101 modificado con <i>bacillus thuringiensis israelensis</i> .	FAAS	Mendil y col., 2008
Cd, Co, Ni, Pb	Preconcentración sobre microesferas de poliestireno-divinilbenceno modificadas con 8-hidroxiquinolina	TXRF	Askun y col., 2008

Tabla 2.3 (cont.). Resumen de los métodos de preconcentración de metales traza en agua de mar mediante extracción en fase sólida desarrollados durante los años 2005-2012

Metal	Procedimiento	Detección ^a	Referencia
Metales traza	Preconcentración con quitosano etilen diamino-N,N,N'-triacético	ICP-MS	Katarina y col., 2008
Cr, Cu, Pb	SPE empleando una resina quelatante fluorada de estireno-divinilbenceno modificada con β -dicetona	ICP-AES	Jan y col., 2007
Metales traza	SPE empleando una minicolumna empaquetada con resina quelatante	ICP-MS	Zhu, 2007
Cd, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn	SPE empleando resina quelatante de poliamino-ácido policarboxílico (NOBIAS chelate-PA1)	ICP-AES / MIP-MS	Yamamoto y col., 2007
Co, Cu, Ni	SPE empleando C activado modificado con ditioxamida (ácido rubeánico)	FAAS	Ghaedi y col. 2007
Ce, Gd, La, Nd, Pr, Sm	SPE empleando poli(b-esteril)-(1,2-metanofullereno-C60)-61-ácido formohidroxámico	ICP-MS	Agrawal, 2007
Hg	SPE empleando silica gel modificada con naranja de xilenol	UV-VIS	Fan y col., 2007
Cd, Co, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, U, V, Zn	Preconcentración con minicolumna quelatante	ICP-MS	Rahmi y col., 2007
Metil-Mercurio	SPE empleando polímero de impronta iónico	ICP-AES/ HPLC-DAD	Büyüektiryaki y col., 2007
Hf, Nb, Ta, W, Zr	SPE empleando una resina de TSK-8-hidroxiquinolina	ICP-MS	Firdaus y col., 2007
Co, Cu, Ni	Preconcentración empleando una resina de polivinil cloruro-polietileno poliamina	FAAS	Li y Meizhou, 2006
Pb	Preconcentración empleando naftaleno microcristalino modificado con ácido esteárico	FI-FAAS	Dadfarnia y col., 2006
Hg	Adsorción y separación empleando gel de sílice modificado con 2-aminotiazol	DPASV	Dias Filho y col., 2006
Cd, Co, Cu, Cr, Fe, Mn, Pb	Complejación con oxina alfabenzoina seguido de la adsorción en una resina Diaion SP-850	FAAS	Soylak y Tuzen, 2006

Tabla 2.3 (cont.). Resumen de los métodos de preconcentración de metales traza en agua de mar mediante extracción en fase sólida desarrollados durante los años 2005-2012

Metal	Procedimiento	Detección ^a	Referencia
Cd, Cu, Ni, Pb, Zn	SPE con Amberlita XAD-4 y Dowex Optipore V-493	GFAAS	Komjarova y Blust, 2006
Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb	Preconcentración con arcilla Celtek	FAAS	Tuzen y col., 2006
Tierras Raras	Preconcentración empleando una minicolumna empaquetada con resina quelatante	ICP-MS	Zhu y col., 2006
Cu	Preconcentración con adsorbente quelatante (esferas de agarosa activadas con bis(2-aminopiridil)dioxima (APD) enlazado químicamente)	FAAS	Hashemi y col., 2005
Eu, Lu, Nd	SPE con naftaleno modificado con 5,7-dicloro-8-hidroxiquinolina	FAAS	Biju y Rao, 2005
Co, Cu, Zn	Preconcentración en resina de intercambio aniónico DOWEX modificada con 4-(2-piridilazo)-resorcinol	EDXRF	Jiang y col., 2005
Metales traza	Preconcentración en <i>tándem</i> con Chelex-100	ICP-MS	Zhu y col., 2005a
Hg	Complejación con N,N'-bis(2-mercaptofenil)etanodiamida y SPE en columna de gel de sílice	UV-VIS	Kara y Tekin, 2005
Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, U, Y, Zn y Tierras Raras	Preconcentración en minicolumna empaquetada con resina quelatante	ICP-MS	Zhu y col., 2005b
Tierras Raras	Preconcentración en minicolumna empaquetada con nanotubos de carbono	ICP-AES	Liang y col., 2005

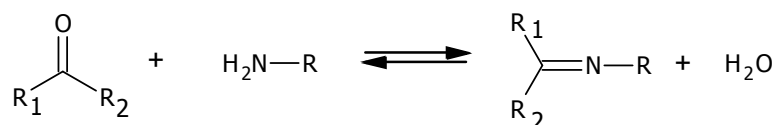
^a CV-AAS: Espectroscopía de Absorción Atómica con vapor frío; DPASV: Voltametría de Redisolución Anódica Diferencial de Impulso; EDXRF: Espectrometría de Fluorescencia de Rayos X por Energía Dispersiva; FAAS: Espectroscopía de Absorción Atómica con llama; FI-GFAAS: Espectroscopía de Absorción Atómica con horno de grafito con inyección en flujo; FI-FAAS: Espectroscopía de Absorción Atómica con llama con inyección en flujo; FI-ICP-MS: Espectroscopía de Masas con fuente de Plasma Acoplado Inductivamente con inyección en flujo; GFAAS: Espectroscopía de Absorción Atómica con horno de grafito; HPLC-DAD: Cromatografía Líquida de Alta Resolución con diodo array; ICP-AES: Espectroscopía de Emisión Atómica con fuente de Plasma Acoplado Inductivamente; ICP-MS: Espectroscopía de Masas con fuente de Plasma Acoplado Inductivamente; MC-ICP-MS: Espectroscopía de Masas Multicolector con fuente de Plasma Acoplado Inductivamente; MIP-MS: Espectrometría de Masas con Plasma Inducido por Microondas; TXRF: Fluorescencia de Rayos X con Reflexión Total; UV-VIS: Espectrofotometría Ultravioleta-Visible.

2.4. Aplicabilidad de las hidrazonas en extracción en fase sólida con discos de membrana

Dado que los metales, por lo general, no interaccionan directamente con los adsorbentes comúnmente empleados en SPE, es necesario recurrir a su modificación mediante el empleo de reactivos orgánicos que complejen el metal de interés.

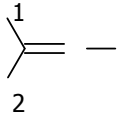
En la sección 2.2.3 se describieron las ventajas del empleo de discos de membrana de SDB por lo que se proponen en esta tesis para el desarrollo de un método para preconcentrar y separar iones Cu(II). Para ello se estudió la posibilidad de aplicar algún compuesto de la familia de las hidrazonas en la modificación del disco y así favorecer la retención metálica. Estos reactivos son ligandos con propiedades quelatantes muy interesantes y potencialmente muy útiles en este tipo de metodologías.

Las hidrazonas son un grupo importante de ligandos tipo *imino*, los cuales se caracterizan por la presencia de un doble enlace C=N, y se sintetizan de manera simple mediante una reacción de condensación entre un compuesto carbonílico y aminas primarias:

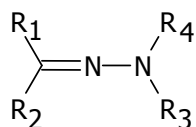


Según la naturaleza del grupo R, se obtienen distintos grupos de compuestos orgánicos: oximas, acinas, semicarbazonas, tiosemicarbazonas e hidrazonas (Tabla 2.4).

Tabla 2.4. Grupo imino y sustituciones más características

	Grupo R	Grupo de compuestos
	-OH	Oximas
	-N=CR ₁ R ₂	Acinas
	-NH-CO-NH ₂	Semicarbazonas
	-NH-CS-NH ₂	Tiosemicarbazonas
	-N-R ₃ R ₄	Hidrazonas

Las *hidrazonas* son azometinos caracterizados por la presencia de una agrupación triatómica C=N-N y se representan de la siguiente forma:



donde R₁, R₂, R₃ y R₄ representan la existencia de cuatro radicales. El átomo de nitrógeno del grupo azometino (C=N) recibe el nombre de nitrógeno imínico y el inmediatamente posterior se denomina nitrógeno amínico, el cual a su vez puede presentar sustituciones de diversa naturaleza.

La facilidad de síntesis y la elevada reactividad que presentan las hidrazonas ha hecho posible su aplicación en numerosos campos.

En el campo de la medicina, puede señalarse su utilización como agentes antiinflamatorios [Moldovan y col., 2011], antimalárico [Fattorusso y col., 2008] antitumorales y anti-VIH [Savini y col., 2004], antibacterianos [Sharma y col., 2011] y antimicrobianos [Metwally y col., 2006; Sankar y Pandiarajan, 2010]. Además se han aplicado para el tratamiento de la tuberculosis [Kaymakçioğlu y col., 2006; Sankar y Pandiarajan, 2010], leucemia y enfermedades mentales. Asimismo, las hidrazonas son empleadas para la determinación de diversos compuestos que forman parte de ciertos fármacos [de la Peña y col., 1993; Sreedhar y col., 1996; Sastry y col., 1997; Sastry y col., 1998], así como de productos cosméticos [Karlberg y col., 1998]. Del mismo modo, las hidrazonas son aplicadas habitualmente en agricultura, utilizándose como componentes de diversos plaguicidas o como agentes reguladores del crecimiento de algunas plantas [Suvarapu y col., 2012]. Las hidrazonas han sido utilizadas igualmente en estudios medioambientales, concretamente para la determinación y control en el aire de compuestos orgánicos que pueden llegar a ser importantes contaminantes atmosféricos, tales como aldehídos y cetonas [Zurek y Karst, 2000], acetaldehído [Lindahl y col., 1996; Possanzini y Dipalo, 1997], formaldehído [Chan y Xie, 1997; Kleindienst y col., 1998], o para la determinación de compuestos fenólicos [Fiehn y Jekel, 1997; Russell y Burton, 1999] y aminocetonas [Fiehn y Jekel, 1997] que pueden estar presentes en aguas residuales.

Entre otras aplicaciones, y concretamente dentro del campo de la Química Analítica, han sido empleadas para la detección y determinación de iones metálicos en muestras de agua, obteniendo importantes resultados [Granado-Castro, 2004a; Granado-Castro, 2004b; Irigoyen, 2006; Aouarram y col., 2010]. En este último aspecto, se aprovecha la tendencia de las hidrazonas para formar quelatos coloreados con iones metálicos, generalmente con los metales de transición. Estos quelatos presentan una alta absortividad molar y son fácilmente extraíbles en disolventes orgánicos inmiscibles en agua. La hidrazona, que actúa

como ligando multidentado, puede coordinarse a los metales a través de uno de los átomos de nitrógeno o en combinación de uno de éstos y algún átomo electronegativo tal como el azufre o el oxígeno. Los quelatos metálicos originados, en general, son determinados posteriormente por técnicas espectroscópicas de absorción o fluorescencia molecular, según las características del complejo metálico.

Dependiendo de la naturaleza de sus sustituyentes, pueden distinguirse varios tipos de hidrazonas. Estos sustituyentes pueden ser: protones, radicales alquilo, radicales arilo, radicales acilo, radicales O-alquilo, radicales O-arilo, así como dióxido de nitrógeno o halógenos.

Las aroilhrazonas son un subgrupo de hidrazonas que se caracterizan por tener un radical aroilo unido al nitrógeno amínico ($>C=N-NH-CO-Ar$). La presencia de un grupo carbonilo, en posición contigua a la agrupación triatómica fundamental de toda hidrazona ($>C=N-N<$), confiere a estas moléculas unas características especiales y gran capacidad para formar quelatos metálicos. De esta forma, las aroilhrazonas muestran un variado comportamiento como ligando, que depende de las posiciones de coordinación que presenten, pudiendo actuar como ligandos bidentados, tridentados, tetradentados o pentadentados formando complejos coloreados, principalmente con los metales de transición.

Entre las aroilhrazonas, especial atención merecen las saliciloilhrazonas, en las que el radical arilo de la aroilhrazona es un grupo fenólico en posición orto que puede participar también en la coordinación. Debido a que forman complejos con numerosos iones metálicos, las saliciloilhrazonas se han empleado extensamente en métodos de determinación espectrofotométricos y espectrofluorimétricos [Gallego y col., 1978; Gallego y col., 1979; García-Vargas y col., 1980; García-Vargas y col., 1982; Gallego y col., 1982a], habiéndose estudiado además la potencialidad de estos compuestos como agentes de preconcentración de trazas metálicas por extracción líquido-líquido.

2.5. Un nuevo método de análisis de Cu(II) por Extracción en Fase Sólida

El objetivo central de este trabajo consiste en el desarrollo de un método de preconcentración y posterior determinación por Espectroscopía de Absorción Atómica de trazas de cobre en muestras acuosas para su aplicación en la detección de la contaminación por este metal en aguas naturales.

Para llevar a cabo el proceso de preconcentración se ha elegido un sistema de extracción en fase sólida por las características y ventajas que presenta frente a otros

sistemas empleados con la misma finalidad y que se han descrito en la sección 2.2. de este capítulo.

Como se ha mencionado, la extracción en fase sólida con disco constituye una técnica de preconcentración ampliamente utilizada para el aislamiento de determinados analitos y la simplificación de la matriz en muestras con propiedades desfavorables para el análisis directo. Esta técnica precisa de una membrana, en forma de disco, con partículas adsorbentes que retengan el analito. La propuesta que se realiza es modificar físicamente el disco con un ligando quelatante del metal a determinar. Cuando se produce el paso de la muestra con el analito, éste es complejoado por el reactivo orgánico, reteniéndose en la membrana y produciendo su preconcentración. Posteriormente, se utilizará un eluyente adecuado que sea capaz de romper el complejo reactivo-metal que se forma en la superficie del disco, permitiendo la determinación del metal preconcentrado en el eluato. Por tanto, es de gran interés la búsqueda de reactivos selectivos y sensibles que sean aplicables a la preconcentración de metales traza de interés medioambiental.

2.5.1. Estudios previos para la elección del reactivo orgánico para SPE

Las características que debe cumplir un reactivo orgánico para que sea aplicable en la técnica de extracción en fase sólida con inmovilización física, para la preconcentración de metales trazas, son las siguientes:

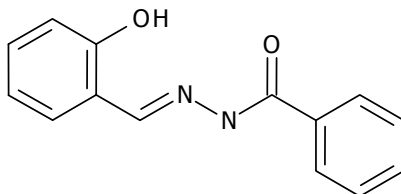
- Debe quedar retenido en el adsorbente que forme el disco. Por ello, se han seleccionado para este estudio discos "EmporeTM" de octadecil sílice (C₁₈) y de poliestireno divinilbenceno (SDB), ambos con diferente polaridad, para poder estudiar la aplicabilidad de diversos reactivos orgánicos.
- Debe ser capaz de formar un complejo con el metal, que por sus características quede retenido en el disco.
- La constante termodinámica de formación del complejo debe ser suficientemente alta para que se puedan obtener rendimientos adecuados en el proceso de preconcentración.
- La cinética de formación del complejo metálico debe ser relativamente alta para que mientras se pase la muestra a través del disco, el complejo se vaya formando a una velocidad tal que haga el método viable.

Así pues, se han realizado una serie de experiencias en las que se han utilizado 3 reactivos orgánicos diferentes del grupo de las aroilhidrazonas, estudiándose su capacidad de retención en el disco y su reactividad con varios metales, con la finalidad de encontrar

aquél que cumpla las condiciones adecuadas para poder desarrollar la técnica de preconcentración seleccionada.

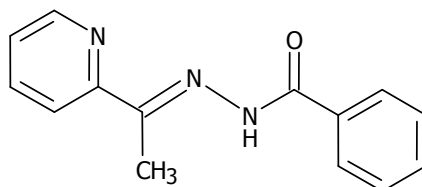
Estos 3 reactivos fueron los siguientes:

a) 2 HBBH: 2-hidroxibenzaldehído benzoilhidrazona

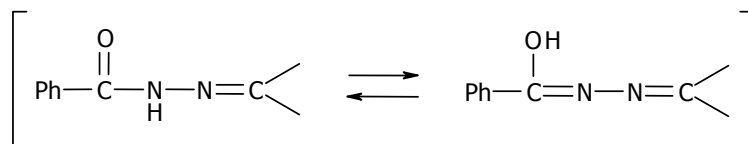


Esta benzoilhidrazona tiene un pK_1 de 6,77 y un pK_2 de 9,11. En medio neutro o ligeramente ácido es un ligando bidentado no cargado. El grupo hidroxilo de la molécula hace posible que la 2HBBH forme puentes de hidrógeno en disolución. En medio básico, este reactivo actúa como ligando tridentado cargado negativamente (con carga -1). Se ha estudiado su reactividad con Ni(II), Cu(II), Mn(II), Zn(II), Co(II), Pb(II), Cd(II) y Bi(III) y se ha demostrado que es capaz de formar complejos con ellos [Katyal y Dutt, 1975; Cordier y col., 2004; Lu y col., 2006; Espada-Bellido y col., 2009].

b) 2 APBH: 2-acetilpiridina benzoilhidrazona

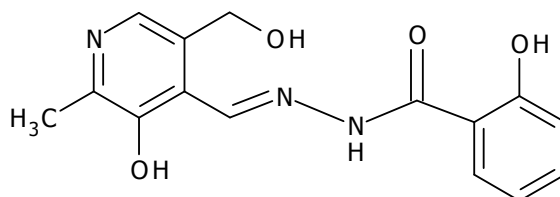


Este reactivo tiene un pK_1 de 3,6 y un pK_2 de 11,1. La primera constante de ionización puede atribuirse a la protonación del nitrógeno piridínico y la segunda constante es debida a la desprotonación del hidrógeno en el grupo -CONH-, cuando éste se tautomeriza según la siguiente reacción:



Se ha demostrado que este reactivo forma complejo con Pb(II), Mn(II), Ga(III), Zn(II), Ti(IV), Hg(II), Ni(II), Bi(III), V(V), Fe(II), Pd(II), Cu(II), Co(II), Cd(II), y Fe(III) [García-Vargas y col., 1981; García-Vargas y col., 1984; Granado-Castro y col., 2004a; Granado-Castro y col., 2004b; Domínguez-Lledó y col., 2007].

c) PSH: *piridoxal saliciloilhidrazona o saliciloilhidrazona del piridoxal*



Esta saliciloilhidrazona tiene un valor de pK_1 de 4,0 y un pK_2 de 7,9. La primera constante de ionización puede atribuirse a la protonación del nitrógeno piridínico, el segundo pK corresponde a la desprotonación del radical $-CH_2OH$ que posee el reactivo.

Se ha demostrado que este reactivo forma complejo con Al(III), Cu(II), Ni(II), Ti(IV), Ga(III), Co(II), Zn(II) y Zr(IV), entre otros [Gallego y col., 1982b; Gallego y col., 1983a; Gallego y col., 1983b; Aouarram y col., 2010].

Las pruebas previas de aplicabilidad que se realizaron con estos tres reactivos se llevaron a cabo con discos de C_{18} . Para ello se comenzó el estudio evaluando la retención de las trazas metálicas a diferentes pH sin empleo de reactivo. Estos valores se consideran como los “blancos” de la retención del metal para ser comparados con la retención mediante el empleo del reactivo orgánico que se utilice.

En la Tabla 2.5, se pueden observar los valores de recuperación obtenidos para cada metal, tras el proceso de extracción sin reactivo. Los porcentajes de recuperación se calcularon a partir de la concentración teórica obtenida tras la preconcentración y elución de una muestra de 500 mL que contenía 40 $\mu\text{g/L}$ de metal, de manera que obtener un 100% de recuperación, significaba que el eluato (de volumen 10 mL) presentaba una concentración final de 2 mg/L de metal. El pH de la muestra fue ajustado con NaOH 0,1 mol/L y/o HNO_3 0,1 mol/L. No se realizaron pruebas a elevados valores de pH porque a partir de pH 8 los discos de C_{18} pueden sufrir hidrólisis. El eluyente utilizado fue una disolución de HNO_3 0,5 mol/L.

De los valores obtenidos en este estudio se puede deducir que un aumento en el pH, y por tanto, en la concentración de NaOH adicionada a la muestra, incrementa la recuperación del metal tras eluir con HNO_3 0,5 mol/L. Este hecho puede estar relacionado

con el aumento de la hidrólisis de los cationes metálicos al subir el pH, llegando a precipitar como hidróxidos de tipo $M(OH)_x$. Estos hidróxidos pueden quedar retenidos en el disco y ser eluidos finalmente por el ácido, proporcionando cierta retención del metal sin empleo de ningún reactivo que favorezca este proceso.

Tabla 2.5. Estudio de la retención metálica en discos C_{18} para $Cd(II)$, $Cu(II)$, $Pb(II)$, $Ni(II)$, $Ag(I)$ y $Co(II)$ sin empleo de reactivo orgánico (concentración de metal en la muestra: 40 $\mu g/L$; factor de preconcentración: 50)

Metal	pH de la muestra	Concentración del extracto (mg/L)	% Recuperación
$Cd(II)$	2,06	< Límite de Detección	-
	4,01	0,028	1,4
	6,03	0,019	0,9
	7,64	0,243	12,1
$Cu(II)$	2,10	< Límite de Detección	-
	4,08	0,015	0,8
	6,19	0,173	8,7
	7,51	0,300	14,5
$Pb(II)$	2,10	0,033	1,7
	4,08	0,085	4,3
	6,19	0,533	26,6
	7,51	0,644	32,2
$Ni(II)$	2,08	0,013	0,7
	4,09	0,044	2,2
	6,11	0,075	3,8
	7,23	0,148	7,4
$Ag(I)$	2,08	< Límite de Detección	-
	4,09	0,007	0,3
	6,11	0,057	2,9
	7,23	0,117	5,9
$Co(II)$	5,97	0,098	4,9

Después de este estudio, se realizaron diferentes pruebas de preconcentración de metal pero utilizando los reactivos orgánicos anteriormente mencionados para incrementar el porcentaje de retención. Para ello, se inmovilizaron 5 mg de reactivo en los discos de membrana antes de la preconcentración de metal. La inmovilización se realizó pasando libre y lentamente por el disco una disolución orgánica del reactivo. En el caso de la 2HBBH y la 2APBH, se utilizó como disolvente 2 mL de cloroformo; en el caso de la PSH, dada su baja solubilidad en cloroformo, se utilizaron 2,5 mL de metanol. En todos los casos, se utilizó como eluyente una disolución de HNO_3 0,5 mol/L. De todos los metales estudiados, se recogen en la Tabla 2.6 los resultados más significativos obtenidos utilizando discos de membrana C_{18} .

Tabla 2.6. Estudio de la retención metálica en discos C_{18} con 2HBBH, 2APBH y PSH inmovilizados a diferentes valores de pH de la muestra (concentración de metal en la muestra: 40 $\mu\text{g/L}$; factor de preconcentración: 50)

Reactivo	Metal	pH de la muestra		% Recuperación
		pH inicial	pH final	
2HBBH	Cu(II)	4,1	4,1	1,5
	Co(II)	6,0	5,4	6,5
	Ni(II)	6,2	6,0	12,2
2APBH	Cu(II)	6,0	6,0	6,2
	Co(II)	6,1	5,8	3,2
	Ni(II)	6,2	6,2	6,5
PSH	Cd(II)	4,1	4,2	-
	Cu(II)	4,6	4,5	13,0

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que los discos C_{18} no proporcionaron recuperaciones muy elevadas, bien porque el reactivo no tuviera las propiedades adecuadas para que se retuviera en el disco, o bien porque el complejo que se pudiera formar, no fuera lo suficientemente apolar como para que se inmovilizara en el disco, ya que el adsorbente octadecil sílice preferentemente retiene compuestos apolares.

Por ello, se realizaron experiencias similares con los discos de membrana SDB. En este caso el reactivo más adecuado para su inmovilización fue la PSH a valores de pH ligeramente ácidos, los cuales presentaban valores de retención de metal muy pequeños en ausencia de reactivo. Los estudios realizados sobre retención metálica se recogen en la Tabla 2.7. De los resultados obtenidos se pudo comprobar que utilizando discos de membrana SDB se conseguía una gran recuperación de cobre de una muestra a pH 4,5 después de la inmovilización del reactivo PSH en el disco. Además, de los estudios realizados para la retención de este metal sin reactivo a diferentes valores de pH se había obtenido previamente una recuperación pequeña del 0,8%.

Tabla 2.7. Estudio de la retención metálica en discos SDB con PSH inmovilizada a valores de pH de la muestra moderadamente ácidos (concentración de metal en la muestra: 40 $\mu\text{g/L}$; factor de preconcentración: 50)

Reactivo	Metal	pH de la muestra		% Recuperación
		pH inicial	pH final	
PSH	Cd(II)	3,0	3,0	0
		4,2	4,5	9,3
		6,3	6,3	5,3
	Cu(II)	4,5	4,6	93,5

Por ello, de todos los estudios preliminares, se seleccionó la **piridoxal saliciloilhidrazona (PSH)** para ser inmovilizada en los discos de membrana SDB y estudiar su aplicabilidad en la preconcentración de trazas de Cu(II) en aguas naturales.

2.5.2. Piridoxal Saliciloilhidrazona

Los primeros estudios realizados sobre la saliciloilhidrazona del piridoxal datan de principios de los años ochenta y fueron llevados a cabo por Gallego y colaboradores, que realizaron por primera vez su síntesis y describieron sus propiedades analíticas [Gallego y col., 1982b].

La síntesis de la saliciloilhidrazona del piridoxal se realiza mediante calentamiento a reflujo de una mezcla equimolecular de saliciloilhidracida (1 g en 20 mL de etanol) y piridoxal (1,1 g en 20 mL de agua destilada), durante 10 minutos (Figura 2.4.). La mezcla se deja a temperatura ambiente. El precipitado filtrado de color amarillo, se recrystaliza dos veces en etanol. El producto obtenido tiene un punto de fusión de 247 °C y el rendimiento de esta síntesis es del 80%.

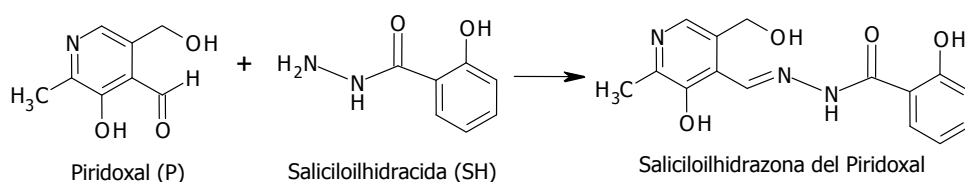


Figura 2.4. Síntesis de la PSH

El análisis elemental del compuesto sintetizado por estos autores fue: C 55,3%, H 5,0%, N 13,4%, O 26,3%, siendo los valores calculados a partir de la fórmula molecular $C_{15}H_{15}N_3O_4 \cdot H_2O$ los siguientes: C 56,4%, H 5,3%, N 13,2%, O 25,1% [Gallego y col., 1982b].

Los datos obtenidos para el análisis elemental de la PSH en estado sólido hacía suponer que el reactivo en estado sólido posee una molécula de agua asociada al grupo $>C=O$, circunstancia que se confirmaría posteriormente con el estudio del espectro de IR, y que era eliminada tras el secado del sólido obtenido durante 1 hora a 110°C.

Los espectros IR de PSH sólido exhiben las bandas de absorción $\nu(N-H)$ y $\nu(N-H^+)$ del anillo de la piridina en 3350, 3130, y 2800 cm^{-1} , respectivamente, cuya protonación se

debe a la migración desde el grupo fenólico al nitrógeno de la piridina, indicando que el ligando existe en forma ceto en estado sólido. Sin embargo, en disolución y en presencia de algunos iones metálicos los ligandos pueden existir en equilibrio con la forma tautomérica del enol. El tautómero, debido a la pérdida del protón enólico, puede actuar como ligando tridentado cargado que coordina a través del oxígeno del grupo fenólico, del nitrógeno del grupo azometino y de los átomos de oxígeno del carbonilo. Otras bandas importantes del IR corresponden a las vibraciones de tensión y flexión fenólicas de $\nu(\text{C}=\text{O})$ en 1520 y 1280 cm^{-1} , y la banda en 1630 cm^{-1} asignada a las vibraciones de tensión de $\nu(\text{C}=\text{N})$ [Mohan, 1992]. Como consecuencia de su estructura molecular, el ligando puede funcionar como un ligando bidentado o tridentado en la complejación de metales. El espectro de absorción molecular UV de la PSH muestra dos máximos de absorción en 230 y 300 nm cuando se disuelve en etanol; estos picos se detectan a 300 y 350 nm en disolución acuosa ácida, presentando un desplazamiento batocrómico en medios alcalinos [Gallego y col., 1982b]. Este ligando también presenta propiedades fluorescentes debido probablemente a la presencia de dos grupos hidroxilo en posición orto [Gallego y col., 1983a].

La saliciloidhidrazona del piridoxal es poco soluble en los disolventes orgánicos más comúnmente usados en las determinaciones fotométricas, tales como metanol, etanol, tetracloruro de carbono, cloroformo, alcohol amílico, nitrobenzono y benceno (con solubilidades menores a $1,2\text{ g/L}$). Sin embargo, en dimetilformamida presenta una solubilidad de 10 g/L [Gallego y col., 1982b].

Las constantes de ionización en medio acuoso a una fuerza iónica de $0,05\text{ mol/L}$ están descritas en la bibliografía, y fueron determinadas por un método simultáneo potenciométrico-fotométrico, encontrándose unos valores medios de las constantes de ionización de $4,0 \pm 0,1$ para pK_1 y de $7,9 \pm 0,1$ para pK_2 [Gallego y col., 1982b].

De igual forma se encuentra descrita la estabilidad de la saliciloidhidrazona del piridoxal, frente a los principales oxidantes y reductores a diferentes valores de pH, destacando que los agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno o el peroxidisulfato de potasio en concentraciones moderadas no afectan de manera apreciable al espectro de absorción de la PSH en disolución acuo-orgánica durante varias horas. Sin embargo los agentes reductores, como la hidracina o la hidroxilamina, afectan fuertemente al reactivo en medio alcalino, pero no en medio ácido [Gallego y col., 1982b].

El estudio de reaccionabilidad de la PSH con los iones metálicos es de gran importancia, de tal forma que está descrita la reacción de la PSH con 40 iones metálicos, a una concentración de 1 mg/mL , para valores de pH de $1,5-2$ (HCl), $4,7$ (tampón acetato) y $10,2$ (tampón amonio). Las características espectrales de los principales complejos solubles (todos ellos de color amarillo o naranja) a pH ácido se muestran en la Tabla 2.8. Todos los

máximos de absorción aparecen en el intervalo de longitudes de onda de 390 a 490 nm [Gallego y col., 1982b]. Puede concluirse que este reactivo presenta una reaccionabilidad muy amplia. Con los cationes Cu(II), Ni(II), Co(II) y Fe(II) presenta una sensibilidad apreciable en tampón acético-acetato, mientras que con Al(III), Zr(IV) y Ti(IV) presenta mayor sensibilidad a pH ácido [Gallego y col., 1982b].

Tabla 2.8. Complejos metálicos con PSH y características espectrales de sus disoluciones acuosas

pH=1,5-2,0 (HCl)			pH=4,7 (Tampón acetato)		
Metal	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\epsilon_{\text{máx}}$ ($\times 10^3$ L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)	Metal	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$\epsilon_{\text{máx}}$ ($\times 10^3$ L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹)
Cu(II)	420	15,8	Cu(II)	390	17,4
Mo(VI)	420	2,4	Fe(II)	420, 490	12,6; 7,0
V(V)	410	4,6	U(VI)	425	6,0
Zr(IV)	405	27,4	Ti(IV)	450	1,8
U(VI)	390	3,0	Al(III)	425	29,7
Ti(IV)	390; 440	5,9; 3,6	Ga(III)	425	10,4
Al(III)	420	20,3	Ni(II)	425	22,0
Ga(III)	420	2,8	Co(II)	420	13,3

La saliciloilhidrazona del piridoxal ha sido aplicada en Química Analítica como reactivo espectrofluorimétrico y espectrofotométrico. De este modo se ha empleado en la determinación espectrofotométrica de Zr(IV) [Gallego y col., 1982b] y Ti(IV) [Gallego y col., 1983a] en la determinación espectrofotométrica y espectrofluorimétrica de Al(III) [Gallego y col., 1983b]. También ha sido aplicado en voltamperometría de redisolución catódica adsortiva (AdCSV) en el análisis de níquel en agua de mar [Aouarram y col., 2010].

En el campo de la medicina la saliciloilhidrazona del piridoxal se ha estudiado por su capacidad quelatante como agente para la terapia oral de las enfermedades debidas a una sobrecarga de hierro [Williams y col., 1982]. Asimismo la PSH ha sido considerada como un análogo de la *piridoxal isonicotinoil hidrazona*, por ser un efectivo quelatante del Fe(III), y por tanto por su potencial para tratar las enfermedades debidas a una sobrecarga de

hierro. La actividad biológica de estos compuestos se relacionó con sus liposolubilidades, medidas por sus coeficientes de partición o reparto entre n-octanol y agua [Edward y col., 1995; Edward y col., 1997; Edward, 1998].

Por todo ello, se puede concluir que la PSH presenta características complejantes muy adecuadas para estudiar su potencial uso como reactivo inmovilizado en discos de membrana para la preconcentración por extracción en fase sólida de diversos metales de interés medioambiental.

2.5.2.1 Estabilidad de la disolución metanólica de PSH

Con el fin de aplicar la PSH en extracción en fase sólida, se estudió previamente la estabilidad de una disolución de este reactivo en metanol, considerado un disolvente muy adecuado para SPE. Para ello, se preparó una disolución de concentración $6,64 \cdot 10^{-4}$ mol/L.

La estabilidad de la disolución se evaluó espectrofotométricamente, midiendo la absorbancia a 390 nm, haciendo uso de un espectrofotómetro UV-Vis, modelo Helios γ 074515, Unicam (Reino Unido). En la Figura 2.5 se encuentran representados los valores de absorbancia frente al tiempo estudiado. Se puede observar que el reactivo fue estable en metanol durante al menos 6 semanas.

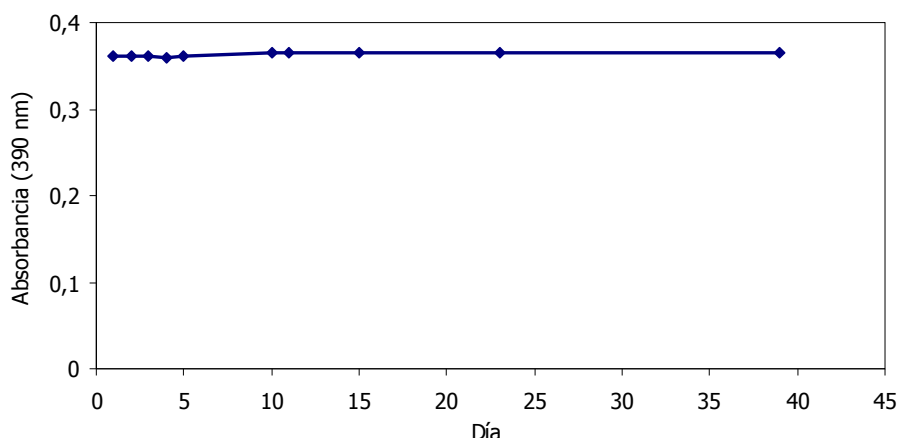


Figura 2.5. Estabilidad de la absorbancia del ligando PSH en disolución metanólica ($6,64 \cdot 10^{-4}$ mol/L) con el tiempo

2.5.3. Estequiometría del complejo Cu-PSH

Con objeto de conocer la composición del complejo formado por Cu y PSH, se realizó el estudio de su estequiometría mediante dos métodos diferentes: método de las variaciones

continuas [Kirkbright y col., 1965; Job, 1928] y método de la razón molar [Skoog y col., 2005; Yoe y Jones, 1944]. Este último método puede llevarse a cabo bien manteniendo la concentración de metal constante, o manteniendo la concentración de ligando constante.

Dado que estos métodos están basados en medidas espectrofotométricas en UV-Vis, se procedió a determinar previamente la longitud de onda de máxima absorción para el complejo en disolución acuometanólica. Para ello, se preparó una disolución de 10 mL que contenía 2 mL de tampón acético/acetato 4 mol/L a pH 4,5; 0,5 mL de disolución metanólica de PSH $6,64 \cdot 10^{-4}$ mol/L; 0,5 mL de Cu(II) $6,64 \cdot 10^{-4}$ mol/L, y se midió el espectro de absorción (Figura 2.6). A partir de los resultados obtenidos, se seleccionó como longitud de onda de máxima absorción del complejo el valor de $\lambda=420$ nm.

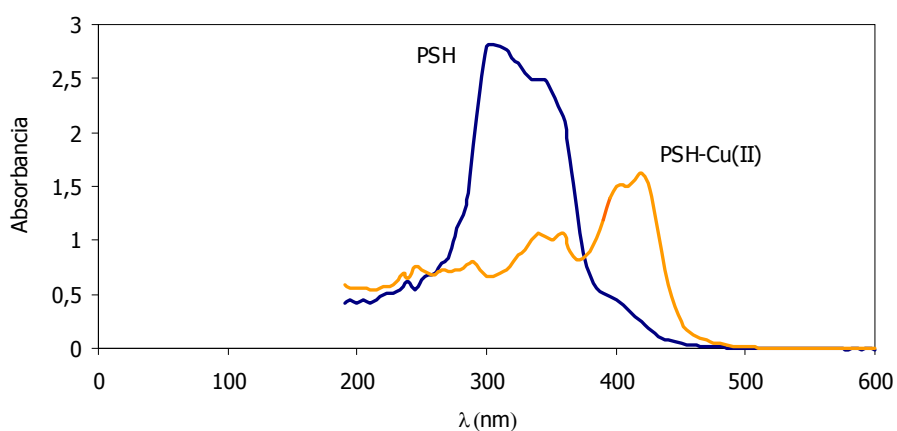


Figura 2.6. Espectro de absorción UV-Vis de la disolución de Cu(II)-PSH a pH 4,5 ($[Cu(II)] = 3,32 \cdot 10^{-5}$ mol/L; $[PSH] = 3,32 \cdot 10^{-5}$ mol/L)

Estos métodos tienen la particularidad de que proporcionan resultados más fácilmente cuando el reactivo no absorbe a la longitud de onda máxima del complejo. En este caso, dado que el reactivo presenta cierta absorbancia a 420 nm, los métodos mencionados pueden llevarse a cabo aplicando una ligera modificación en los blancos preparados, que se detallará a continuación en cada una de las secciones.

En estos métodos se van a obtener siempre dos rectas con pendientes distintas. En la primera recta, los valores de absorbancia son bajos y cualquier error puede generar resultados inexactos. Por ello, es importante centrarse en evitar los errores en la primera recta, mediante la utilización de los blancos adecuados.

2.5.3.1. Método de la razón molar

Una vez establecida la longitud de onda de máxima absorción (420 nm), se procedió a estudiar la estequiometría utilizando el método de la razón molar. Este método consiste en la medición de la señal espectrofotométrica del complejo metal-ligando en una serie de disoluciones en las que se mantiene constante la concentración de uno de los reactivos, mientras que se varía la del otro [Skoog y col., 2005]. En este estudio se llevaron a cabo los dos procedimientos: método de la razón molar con metal constante y método de la razón molar con ligando constante.

- *Método de la razón molar con la concentración de metal constante*

En este caso se mantuvo constante la concentración de Cu(II) mientras se fue incrementando la concentración de ligando PSH.

En la Tabla 2.9 se indica la composición de las diferentes disoluciones que se prepararon para el estudio de la estequiometría. Todas las disoluciones se enrasaron con agua desionizada hasta 10 mL, conteniendo la misma relación de volumen metanol/agua para evitar diferencias de matriz. Se utilizó una disolución tampón acético/acetato 4 mol/L a pH 4,5, dos disoluciones de Cu(II) de $3,32 \cdot 10^{-4}$ y $6,64 \cdot 10^{-4}$ mol/L y dos disoluciones metanólicas de PSH de $3,32 \cdot 10^{-4}$ y $6,64 \cdot 10^{-4}$ mol/L, para evitar tomar volúmenes demasiado pequeños. El blanco fue preparado con 1 mL de tampón, 1,5 mL de metanol y fue enrasado con agua hasta 10 mL.

En este método, antes de llegar a la relación óptima metal-ligando, el metal queda en exceso, por lo que las absorbancias se deberían corregir con un blanco que contuviera la cantidad de metal que queda en exceso en cada disolución. Sin embargo, previamente al estudio de la estequiometría, se demostró que el Cu(II) en disolución no absorbe a 420 nm, por lo que no influye en la medida de la absorbancia. Es por ello, que las absorbancias se midieron frente a un blanco preparado de la misma manera que las disoluciones de estudio, pero sin contener metal ni reactivo.

El resultado del método de la razón molar manteniendo constante la concentración de metal se muestra en la Figura 2.7. Se obtienen dos rectas por regresión lineal, y el punto de cruce entre ellas indica que la relación molar entre PSH:Cu es de aproximadamente 1,5, lo que implica que la estequiometría del complejo es 3 PSH:2 Cu.

Tabla 2.9. Composición de las disoluciones para la determinación de la estequiometría del complejo PSH-Cu(II) por el método de la razón molar con metal constante

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V_T (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
V_{Cu} (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
$V_{PSH,1}$ (mL)	0	0,2	0,4	0,6	1	-	-	-	-	-
$V_{PSH,2}$ (mL)	-	-	-	-	-	0,7	0,9	1,1	1,3	1,5
V_{Met} (mL)	1,5	1,3	1,1	0,9	0,5	0,8	0,6	0,4	0,2	0
$R_{PSH/Cu}$	0	0,2	0,4	0,6	1	1,4	1,8	2,2	2,6	3
Abs (420 nm)	0	0,096	0,227	0,340	0,597	0,694	0,887	0,917	0,932	0,956

V_T : volumen de tampón acético/acetato 4 mol/L de pH 4,5; V_{Cu} : volumen de Cu(II) $6,64 \cdot 10^{-4}$ mol/L; $V_{PSH,1}$: volumen de PSH $3,32 \cdot 10^{-4}$ mol/L; $V_{PSH,2}$: volumen de PSH $6,64 \cdot 10^{-4}$ mol/L; V_{Met} : volumen de metanol; $R_{PSH/Cu}$: relación molar PSH/Cu(II)

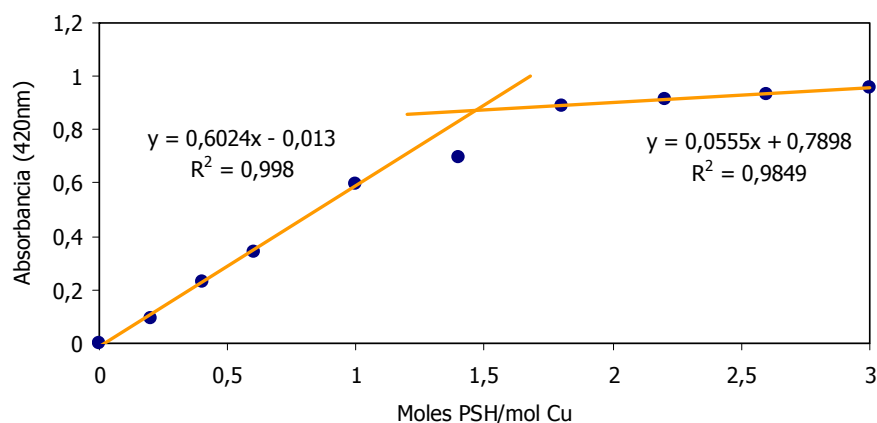


Figura 2.7. Aplicación del método de la razón molar con metal constante en el cálculo de la estequiometría del complejo PSH-Cu(II) ($[Cu(II)] = 3,32 \cdot 10^{-5}$ mol/L)

▪ *Método de la razón molar con la concentración de ligando constante*

En este método se mantuvo constante la concentración de PSH mientras que se fue incrementando la concentración de Cu(II).

En las Tablas 2.10 y 2.11 se indica la composición de las diferentes disoluciones y blancos que se prepararon para el estudio de la estequiometría. Las disoluciones se prepararon de manera análoga a las anteriores y utilizando las mismas disoluciones de partida.

En este método, antes de llegar a la relación óptima metal-ligando, el reactivo que queda en exceso es el ligando, que sí absorbe a 420 nm. Por lo tanto y teniendo en cuenta la estequiometría que ha resultado en el método anterior, se debe preparar un blanco para cada muestra, que deberá contener la diferencia estequiométrica de ligando en exceso. A partir de la relación óptima metal-ligando, el blanco no contendrá ligando puesto que todo se ha consumido, y se utilizaría un mismo blanco para todas las muestras siguientes.

El resultado del método de la razón molar manteniendo constante la concentración de ligando se muestra en la Figura 2.8. El punto de cruce entre las rectas indica que la relación molar entre Cu:PSH es de aproximadamente 0,65, lo que confirma la estequiometría del complejo de 3 PSH:2 Cu.

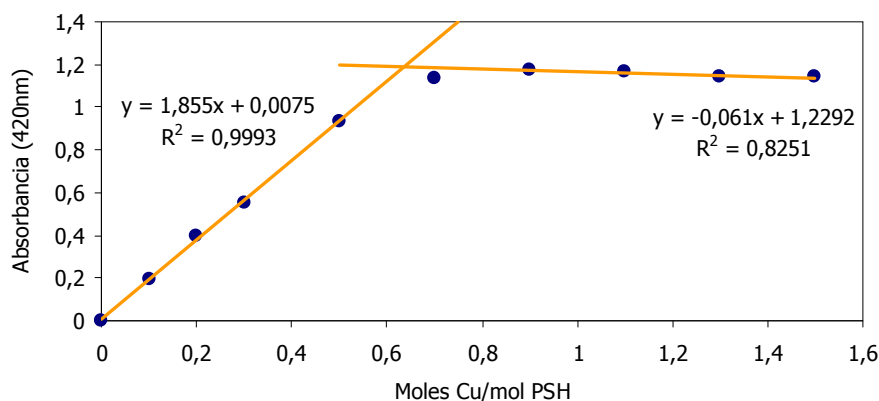
Tabla 2.10. Composición de las disoluciones para la determinación de la estequiometría del complejo PSH-Cu(II) por el método de la razón molar con ligando constante

Muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V _T (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
V _{Cu,1} (mL)	0	0,2	0,4	0,6	1	-	-	-	-	-
V _{Cu,2} (mL)	-	-	-	-	-	0,7	0,9	1,1	1,3	1,5
V _{PSH} (mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
R _{Cu/PSH}	0	0,1	0,2	0,3	0,5	0,7	0,9	1,1	1,3	1,5
Abs (420 nm)	0	0,196	0,393	0,555	0,934	1,137	1,172	1,170	1,141	1,141

Tabla 2.11. Composición de los blancos para la determinación de la estequiometría del complejo PSH-Cu(II) por el método de la razón molar con ligando constante

Blancos	1	2	3	4	5	6-10
V_T (mL)	1	1	1	1	1	1
V_{Cu} (mL)	0	0	0	0	0	0
V_{PSH} (mL)	1	0,85	0,7	0,55	0,25	0
V_{Met} (mL)	0	0,15	0,3	0,45	0,75	1

V_T : volumen de tampón acético/acetato 4 mol/L de pH 4,5; $V_{Cu,1}$: volumen de Cu(II) $3,32 \cdot 10^{-4}$ mol/L; $V_{Cu,2}$: volumen de Cu(II) $6,64 \cdot 10^{-4}$ mol/L; V_{PSH} : volumen de PSH $6,64 \cdot 10^{-4}$ mol/L; V_{Met} : volumen de metanol; $R_{Cu/PSH}$: relación molar Cu(II)/PSH

**Figura 2.8.** Aplicación del método de la razón molar con ligando constante en el cálculo de la estequiometría del complejo PSH-Cu(II) ($[PSH] = 6,64 \cdot 10^{-5}$ mol/L)

2.5.3.2. Método de las variaciones continuas

Tras realizar el estudio de la estequiometría con el método de la razón molar, se procedió a confirmar el resultado aplicando el método de las variaciones continuas. Este método consiste en medir la señal espectrofotométrica del complejo metal-ligando en una serie de disoluciones en las que se varía progresivamente las cantidades de los reactivos, pero se conserva su suma constante. Las proporciones de sus concentraciones respectivas se ajustan gradualmente desde una disolución que contenga únicamente ligando hasta una

disolución que sólo contenga metal. Así se variará también la extensión de la reacción, la cual pasará por un máximo, correspondiente al punto estequiométrico [Kirkbright y col., 1965].

En las Tablas 2.12 y 2.13 se recoge la composición de las disoluciones y los blancos preparados para la determinación de la estequiometría. Las concentraciones de las disoluciones de partida de disolución reguladora, metal y ligando fueron las mismas a las utilizadas en el método anterior. Los blancos para la primera recta se prepararon sin metal y con la diferencia estequiométrica de ligando; mientras que para la segunda serie de disoluciones se preparó un único blanco sin metal ni ligando.

En la Figura 2.9 se han representado los resultados obtenidos. La intersección de las dos líneas mostró la fracción molar X_{Cu} característica del complejo de 0,4 como la indicativa de la estequiometría del complejo, correspondiendo a una relación 3:2 (PSH:Cu).

Tabla 2.12. Composición de las disoluciones para la determinación de la estequiometría del complejo PSH-Cu(II) por el método de las variaciones continuas

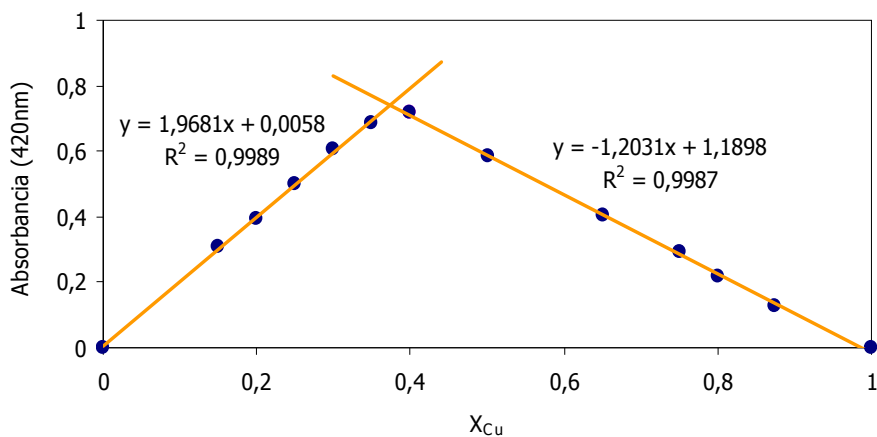
Muestra	1	2	3	4	5	6	7
V_T (mL)	1	1	1	1	1	1	1
V_{Cu} (mL)	0	0,150	0,200	0,250	0,300	0,350	0,400
V_{PSH} (mL)	1	0,850	0,800	0,750	0,700	0,650	0,600
V_{Met} (mL)	0	0,150	0,200	0,250	0,300	0,350	0,400
X_{Cu}	0	0,150	0,200	0,250	0,300	0,350	0,400
Abs (420 nm)	0	0,311	0,396	0,499	0,605	0,684	0,717

Muestra	8	9	10	11	12	13
V_T (mL)	1	1	1	1	1	1
V_{Cu} (mL)	0,500	0,650	0,750	0,800	0,875	1
V_{PSH} (mL)	0,500	0,350	0,250	0,200	0,125	0
V_{Met} (mL)	0,500	0,650	0,750	0,800	0,875	1
X_{Cu}	0,500	0,650	0,750	0,800	0,875	1
Abs (420 nm)	0,585	0,403	0,293	0,217	0,128	0

Tabla 2.13. Composición de los blancos para la determinación de la estequiometría del complejo PSH-Cu(II) por el método de las variaciones continuas

Blancos	1	2	3	4	5	6	7-13
V_T (mL)	1	1	1	1	1	1	1
V_{Cu} (mL)	0	0	0	0	0	0	0
V_{PSH} (mL)	1	0,625	0,500	0,375	0,250	0,125	0
V_{Met} (mL)	0	0,375	0,500	0,625	0,750	0,875	1

V_T : volumen de tampón acético/acetato 4 mol/L de pH 4,5; V_{Cu} : volumen de Cu(II) $6,64 \cdot 10^{-4}$ mol/L; V_{PSH} : volumen de PSH $6,64 \cdot 10^{-4}$ mol/L; V_{Met} : volumen de metanol; X_{Cu} : fracción molar Cu(II)

**Figura 2.9.** Aplicación del método de las variaciones continuas en el cálculo de la estequiometría del complejo PSH-Cu(II) ($[PSH] + [Cu(II)] = 6,64 \cdot 10^{-5}$ mol/L)

Por tanto, por ambos métodos se obtuvieron idénticos resultados, demostrando que la estequiometría del complejo es 3 PSH:2 Cu.

2.5.4. Constante de formación del complejo Cu(II)-PSH

La formación de un complejo ML, a partir de un ligando L y un ion central M, es una reacción reversible, definida como:



cuya constante de equilibrio:

$$K = \frac{[ML]_{eq}}{[M]_{eq}^n [L]_{eq}^m} \quad (2.2)$$

se denomina constante de formación o constante de estabilidad del complejo. Es decir, cuanto mayor es el valor de la constante de formación de un complejo, más favorecida está su formación a partir de sus componentes (metal y ligando), y por tanto el complejo es más estable.

La constante de formación del complejo estudiado se calculó utilizando los métodos de la razón molar y el método de las variaciones continuas.

En el método de la razón molar con ligando constante, como ha sido indicado anteriormente, se preparan disoluciones conteniendo todas la misma concentración del ligando pero diferentes concentraciones del ion metálico central. Se obtienen diferentes relaciones o razones de concentración de metal respecto del ligando (R). A bajos valores de R, cuando el ligando está en exceso, el metal se encuentra en defecto y el incremento en la absorbancia del complejo será proporcional a los moles de metal agregados. Si el complejo es infinitamente estable se obtendría una recta creciente hasta el punto en que R alcanza un valor igual al cociente estequiométrico del complejo. A partir de ese punto para mayores valores de R se obtendría un valor constante de absorbancia. Para complejos reales, cuya constante sea elevada pero no infinita, se obtendrá una curva a la que se le puede trazar las rectas tangentes para bajos y altos valores de R. Las rectas se cruzarían en el valor de R correspondiente a la estequiometría del complejo y a un valor de Absorbancia (A_{max}) equivalente a que todo el metal y todo el ligando se encuentre formando complejo. La Figura 2.10 muestra el comportamiento descrito.

Para la determinación de la constante de formación del complejo se ha hecho uso de la curva de absorbancia frente a la razón molar (tanto $R_{Cu/PSH}$ como $R_{PSH/Cu}$). Asimismo, se ha realizado el mismo cálculo mediante el método de las variaciones continuas, utilizando la curva de absorbancia frente a la fracción molar de cobre (X_{Cu}). Por tanto, se han obtenido 3 valores diferentes de K, que han sido posteriormente comparados. El procedimiento del cálculo se basa en la diferencia o *GAP* de absorbancia que existe entre el valor correspondiente a la completa formación del complejo (A_{max}), punto en el que se cortan las rectas, y el valor experimental (A_{eq}) en dicho punto cuando la reacción de formación se encuentra en equilibrio.

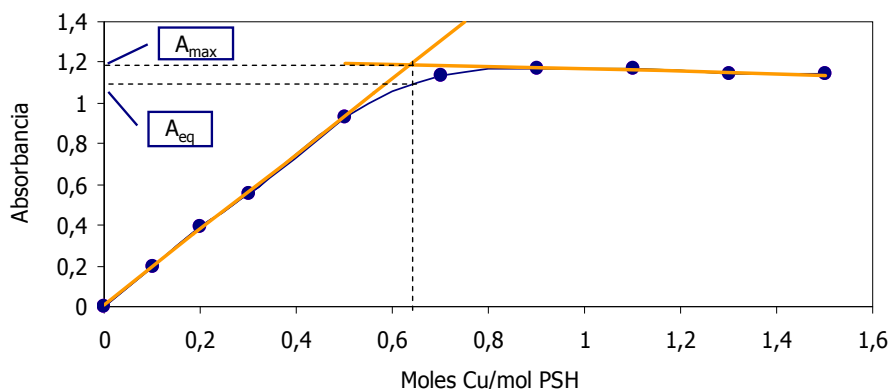


Figura 2.10. Aplicación del método de la razón molar para el cálculo de la constante de formación del complejo Cu(II)-PSH

En cada punto de la curva se conoce la concentración inicial de cobre y de ligando que se ha adicionado, las cuales se relacionan con el valor correspondiente de razón o fracción molar, por medio de la abscisa. Así, en el punto en que las rectas se cruzan, tendremos un valor de razón ($R_{Cu/PSH}$, $R_{PSH/Cu}$) o fracción molar (X_{Cu}) en el *eje x*, un valor de absorbancia A_{max} y A_{eq} en el *eje y*, y las concentraciones iniciales de metal $[Cu]_i$, ligando $[PSH]_i$ añadido, así como la concentración de complejo $[Cu_2PSH_3]_{max}$ calculada a partir de la estequiometría resultante.

Según la Ley de Beer,

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (2.3)$$

siendo ε el coeficiente de absortividad molar ($(\text{mol/L})^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), b la longitud del paso óptico de la muestra, en este estudio 1 cm, y c , la concentración del complejo (mol/L).

Se puede calcular ε utilizando el valor de A_{max} y la concentración máxima que podría obtenerse del complejo si la constante fuera infinita:

$$\varepsilon = \frac{A_{max}}{b \cdot [Cu_2PSH_3]_{max}} \quad (2.4)$$

Una vez obtenido el valor de ε , se podrán calcular las concentraciones en equilibrio del metal $[Cu]_{eq}$, del ligando $[PSH]_{eq}$ y del complejo $[Cu_2PSH_3]_{eq}$, cuyos valores determinarán la constante de formación, K .

$$[\text{Cu}_2\text{PSH}_3]_{\text{eq}} = \frac{A_{\text{eq}}}{b \cdot \varepsilon} \quad (2.5)$$

$$[\text{Cu}]_{\text{eq}} = [\text{Cu}]_i - 2 [\text{Cu}_2\text{PSH}_3]_{\text{eq}} \quad (2.6)$$

$$[\text{PSH}]_{\text{eq}} = [\text{PSH}]_i - 3 [\text{Cu}_2\text{PSH}_3]_{\text{eq}} \quad (2.7)$$

Sustituyendo estos valores en la ecuación de la constante,

$$K = \frac{[\text{Cu}_2\text{PSH}_3]_{\text{eq}}}{[\text{Cu}]_{\text{eq}}^2 [\text{PSH}]_{\text{eq}}^3} \quad (2.8)$$

se obtendría el valor de ésta para cada uno de los tres métodos (Tabla 2.14).

Tabla 2.14. Valores de la constante de formación del complejo Cu_2PSH_3 calculada mediante el método de la razón molar y de las variaciones continuas

Método	K ((mol/L) ⁻⁴)
Razón molar - Cu constante	5,53·10 ²¹
Razón molar - PSH constante	4,14·10 ²¹
Variaciones continuas	5,66·10 ²¹

El valor medio de la constante de formación del complejo y su desviación estándar es de:

$$K = (5,11 \pm 0,8) \cdot 10^{21} \text{ (mol/L)}^{-4}$$

2.5.5. Equipos y metodología de análisis de Cu(II) utilizando extracción en fase sólida

2.5.5.1. Equipos utilizados

A continuación se detalla el material utilizado para llevar a cabo el análisis de Cu(II) mediante extracción en fase sólida:

- El pH de todas las disoluciones fue medido con un pH-metro modelo 2001 (Crison, España) equipado con un electrodo combinado de vidrio-Ag/AgCl 52-02, calibrado mediante patrones de pH 4 y 7.

- Las extracciones se llevaron a cabo en un aparato estándar de filtración Millipore, de 47 mm de diámetro, conectado a una bomba de vacío modelo D95 (Dinko, España).
- Para la determinación de cobre tras la elución después de la extracción en fase sólida se empleó un espectrómetro de absorción atómica, Solaar M-Series Thermo Elemental, Unicam (Reino Unido), con lámpara de cátodo hueco a una longitud de onda de 324,8 nm, utilizando llama de aire-acetileno.

La preparación de las disoluciones utilizadas en este capítulo se encuentra detallada en el Anexo 1.

2.5.5.2. Metodología de análisis de Cu(II) utilizando extracción en fase sólida

El objetivo de este capítulo es desarrollar y optimizar un método adecuado de preconcentración y determinación de trazas metálicas de Cu(II) en aguas naturales. Para ello, se utiliza la extracción en fase sólida con discos de poliestireno divinilbenceno (SDB) que contienen un 10% de PTFE, de 47 mm de diámetro y 0,5 mm de espesor, con un tamaño de poro de 80 Å, un tamaño de partículas de 16 µm y un área superficial de 450 m²/g. Estos discos son estables en el rango de pH 2-12 y son resistentes a la mayoría de disolventes orgánicos.

La extracción en fase sólida consta de 6 etapas esenciales: descontaminación, acondicionamiento, extracción de la muestra, secado, recuperación y lavado del disco.

Descontaminación

Después de colocar el disco en el aparato de filtración (Millipore), se hacen pasar con ayuda de la bomba de vacío 5 mL de metanol para humedecerlo, 10 mL de HNO₃ 1 mol/L, 10 mL de metanol y 10 mL de acetonitrilo. Todos estos disolventes o disoluciones eliminan los contaminantes procedentes del proceso de fabricación y del ambiente, que pueda contener el disco.

Acondicionamiento

Tras secar el disco dejando pasar aire durante varios minutos, se pasa a través del mismo una disolución del reactivo a inmovilizar disuelto en un volumen adecuado de disolvente. En el caso de la PSH se utilizó metanol para disolverla. En el caso de los otros dos reactivos que se han estudiado durante los análisis previos, la 2HBBH (2-hidroxibenzaldehído benzoilhidrazona) y la 2APBH (2-acetilpiridina benzoilhidrazona) se utiliza cloroformo, puesto que son más solubles en dicho disolvente.

La disolución de reactivo se deja pasar libremente, sin el uso de la bomba de vacío para que todo el contenido de reactivo quede retenido lentamente en el disco. Una vez que el disolvente ha pasado a través del disco, éste se deja secar a temperatura ambiente el tiempo necesario para que se evapore el resto de disolvente (aproximadamente entre 5 y 10 minutos).

Finalmente, el disco se lava con 25 mL de agua Milli-Q y se deja secar pasando aire.

De esta manera, el polímero SDB se encuentra modificado con el reactivo y acondicionado para el siguiente proceso, que será el de extracción del metal de la muestra.

Extracción y preconcentración de la muestra

Se humedece el disco con 25 mL de agua Milli-Q y posteriormente, se hace pasar la muestra que contiene el metal a preconcentrar a una velocidad determinada. De esta manera, se forma el complejo entre el metal y el reactivo que quedó retenido en el disco en la etapa anterior.

Secado

Una vez que haya pasado toda la muestra a través del disco, se aplica un alto vacío durante 1 minuto para eliminar los restos de disolución. Este paso es importante, porque el agua que quede retenida en el disco puede producir una dilución del eluyente posterior y reducir la eficiencia de la etapa de elución.

Recuperación o elución

El metal es recuperado pasando un volumen adecuado de disolución de ácido que destruyen el complejo formado y permiten la elución del metal en un pequeño volumen. Este volumen de eluato es recogido en un tubo colector para su posterior análisis por Espectroscopía de Absorción Atómica. Finalmente, se deja que el disco se seque totalmente haciendo pasar aire a vacío.

Lavado del disco

Esta última etapa es esencial para poder seguir utilizando el disco en otros análisis. Consta de 3 pasos: pasar 10 mL de HNO_3 1 mol/L, 10 mL de metanol y 10 mL de H_2O para eliminar los restos de ácido nítrico y metanol.

Finalmente, se deja secar completamente el disco dejando pasar aire a alto vacío. Este paso es muy importante ya que uno de los principales mecanismos de degradación de los discos es la hidrólisis que se podría producir por el contacto de éstos con el agua durante un largo periodo de tiempo. Si en algún caso se llegara a producir degradación, la hidrólisis se puede invertir calentando los discos en una estufa calefactora hasta que el agua que contienen se evapore.

En la Figura 2.11 se ilustran las etapas normalmente empleadas en las técnicas de extracción en fase sólida empleando reactivos orgánicos inmovilizados en el soporte sólido.



Figura 2.11. Etapas del proceso de extracción en fase sólida

Asimismo, en las Figuras 2.12 y 2.13 se muestra el equipo de filtración de 47 mm de diámetro de Millipore empleado en la técnica de extracción en fase sólida.

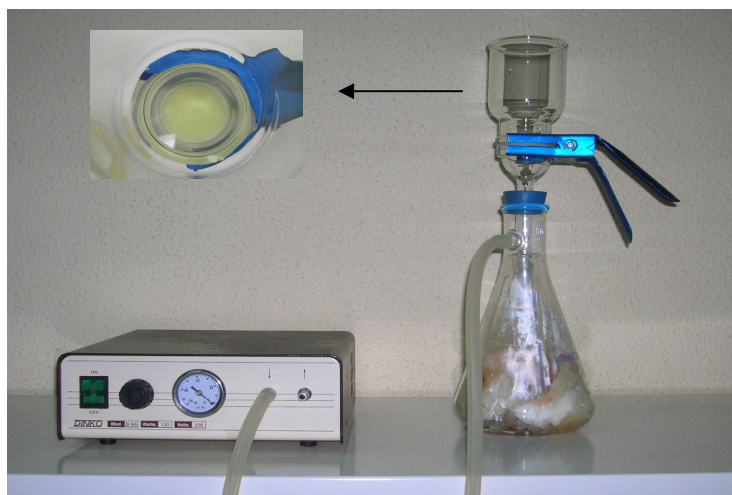


Figura 2.12. Imagen del sistema de extracción en fase sólida con discos

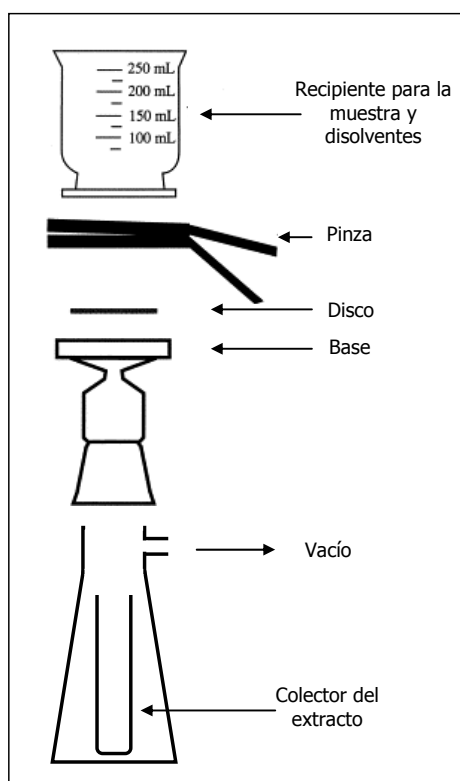


Figura 2.13. Esquema del equipo de filtración empleado en la técnica de extracción en fase sólida con discos

El sistema consta de un recipiente de vidrio, en el cual se vierten con cuidado las distintas disoluciones y la muestra; un soporte donde se coloca el disco de membrana; una pinza que sujeta el recipiente de vidrio y el soporte; y un matraz kitasato que se acopla a la bomba de vacío a través de un tubo de C-Flex. Dentro del matraz se introduce un tubo colector de las disoluciones o extractos obtenidos después de que pasen a través del filtro.

2.5.6. Optimización de la metodología de análisis de Cu(II) por SPE mediante el empleo de PSH

Una vez elegido el reactivo adecuado para desarrollar el método de preconcentración y análisis de trazas de cobre y conocido el complejo metálico que se forma entre el reactivo y

el metal, se pasa a la optimización de los parámetros que influyen en la técnica de preconcentración.

Los parámetros que influyen en el método de extracción en fase sólida son los siguientes:

- *Tipo de eluyente:* existen varios tipos de ácidos que se pueden utilizar como eluyentes de iones metálicos retenidos como complejos orgánicos, a distintas concentraciones. El más adecuado será aquél que consiga destruir de manera efectiva el complejo PSH-Cu para la elución del metal.
- *Volumen de eluyente:* con objeto de obtener altos factores de preconcentración, es necesario encontrar volúmenes pequeños que sean suficientes para destruir el complejo y que eluyan el metal con una elevada recuperación.
- *Valor de pH de las disoluciones acuosas empleadas:* los ligandos orgánicos con carácter ácido/básico pueden estar en su forma neutra o cargada dependiendo del valor del pH del medio. Esta carga puede influir en su capacidad de retención en el disco. Asimismo, el pH también influye en la formación del complejo, por lo que habrá que trabajar con valores de pH apropiados para que el reactivo quede adsorbido sobre el disco de membrana y compleje de forma eficaz al cobre o lo eluya, según la etapa del proceso.
- *Cantidad de reactivo inmovilizado en el disco:* este factor es muy importante en el proceso de extracción en fase sólida. Dado que el equilibrio de formación de complejo depende de la cantidad de reactivo inmovilizado, se debe encontrar un valor que sea adecuado para que todo el metal presente en la muestra quede complejoado con el reactivo. Por ello, se iniciarán los estudios con suficiente cantidad de reactivo, inmovilizando una cantidad inicial de 5 mg de PSH (Peso molecular = 319 g/mol) y preconcentrando una muestra que contiene 20 µg de Cu(II). Estas condiciones corresponden a una relación molar catión:ligando de 1:50.
- *Velocidad de flujo de la muestra y del eluyente:* estos factores son muy importantes desde el punto de vista cinético de la extracción. Será necesario elegir una velocidad de paso de la muestra suficiente para que todos los iones Cu(II) tengan opción de reaccionar con el ligando y formar complejo, quedando retenidos en el disco. Posteriormente, se seleccionará una velocidad de paso del eluyente tal que éste sea capaz de destruir el complejo formado en el disco de manera eficaz.

El estudio previo del comportamiento de estos parámetros químicos fue realizado mediante el método univariante, es decir, estudiando las mejores condiciones para cada una de las variables de forma individual, con el objetivo de conocer el sistema. Este estudio supuso un paso previo a la optimización del método mediante el empleo de un diseño de

experimento, en el que la adecuada elección de las variables (variables de diseño), así como de sus intervalos permitió el diseño final de la metodología. Hay que recordar que el estudio univariante de los parámetros proporciona una fuente muy útil de información inicial del comportamiento de las variables en el proceso. Además sirve para establecer los rangos iniciales en los que serán estudiadas con el diseño, sobre todo para aquellos valores que no vienen determinados por limitaciones propias del sistema.

2.5.6.1. Estudio de la influencia de la naturaleza del eluyente

Se seleccionaron tres ácidos distintos, de los cuales uno es débil (CH_3COOH) y dos son fuertes (HCl y HNO_3) y se aplicaron como eluyentes en la SPE a tres concentraciones diferentes: 0,5, 1 y 2 mol/L.

Las pruebas se realizaron en la siguientes condiciones: se inmovilizaron 5 mg de *saliciloilhidrazona del piridoxal* disueltos en 2,5 mL de metanol; el valor de pH de la muestra (controlado con NaOH 0,1 mol/L y/o HNO_3 0,1 mol/L.) fue aproximadamente de 4,5 conteniendo una concentración de Cu(II) de 40 $\mu\text{g/L}$ (20 μg). El volumen de muestra a preconcentrar fue de 500 mL y el volumen de eluyente utilizado fue de 10 mL, con lo que se obtenían factores de preconcentración de 50 unidades.

a) Estudio del ácido acético como eluyente

El porcentaje de recuperación de Cu(II) obtenido para cada una de las eluciones realizadas con diferentes disoluciones de ácido acético se han detallado en la Tabla 2.15 y se han representado en la Figura 2.14. Al utilizar una concentración baja de ácido acético, se obtuvo una recuperación muy pequeña. Al ir aumentando la molaridad del ácido, aumentó el metal extraído, pero no se llegó a obtener una recuperación cuantitativa. Esto se debe probablemente a que el ácido acético no es un ácido suficientemente fuerte como para favorecer la destrucción del complejo estable Cu-PSH retenido en el disco de membrana.

b) Estudio del ácido nítrico como eluyente

Los valores de porcentaje de recuperación de Cu(II) obtenido para cada una de las eluciones realizadas con ácido nítrico se detallan en la Tabla 2.16 y en la Figura 2.15. En este caso, se puede observar que este eluyente proporcionó resultados más adecuados que el anterior, puesto que se obtuvieron recuperaciones completas del metal, debido probablemente a su naturaleza de ácido fuerte. Así, a partir de una concentración de 1 mol/L ya se obtuvo una extracción cuantitativa.

c) *Estudio del ácido clorhídrico como eluyente*

Los resultados obtenidos para la elución con ácido clorhídrico se resumen en la Tabla 2.17 y se han representado gráficamente en la Figura 2.16. Este ácido proporcionó valores de recuperación más adecuados para valores de concentración bajo o intermedio dentro del intervalo estudiado. Por lo que su utilización disminuye el coste del proceso de extracción al utilizar menos cantidad de ácido.

Como conclusión, tanto el ácido nítrico (1-2 mol/L) como el ácido clorhídrico (0,5-1 mol/L) fueron capaces de eluir de forma eficaz el metal por destrucción del complejo que se formó entre la *salicililhidrazona del piridoxal* y el cobre, y, por tanto, proporcionaron una recuperación cercana al 100%.

Tabla 2.15. Estudio del porcentaje de recuperación de Cu(II) (20 μg) retenido en discos de SDB modificado con PSH (5 mg) para diferentes concentraciones de ácido acético ($n=3$; $V_{\text{eluyente}} = 10 \text{ mL}$)

Concentración Ácido Acético (mol/L)	pH de la muestra		% Recuperación
	pH inicial	pH final	
0,5	4,6	4,4	7,1
1	4,5	4,4	28,0
2	4,6	4,4	83,4

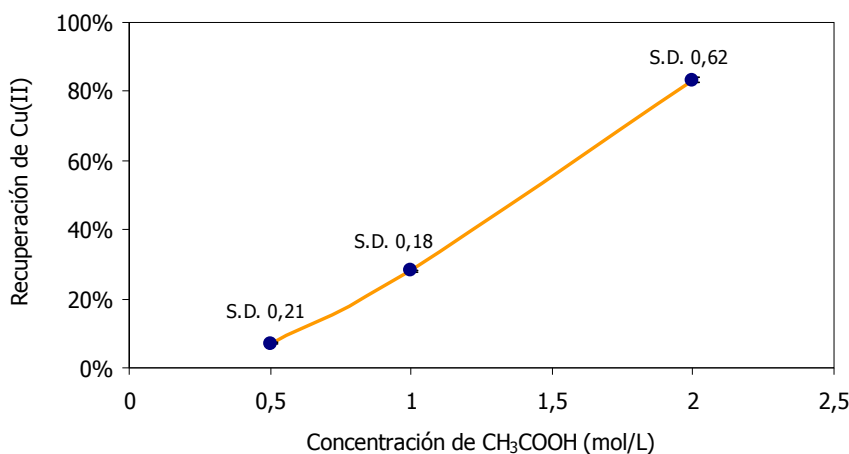


Figura 2.14. Porcentaje de recuperación de Cu(II) (20 μg) con ácido acético

Tabla 2.16. Estudio del porcentaje de recuperación de Cu(II) ($20\ \mu\text{g}$) retenido en discos de SDB modificado con PSH ($5\ \text{mg}$) para diferentes concentraciones de ácido nítrico ($n=3$; $V_{\text{eluyente}}=10\ \text{mL}$)

Concentración Ácido Nítrico (mol/L)	pH de la muestra		% Recuperación
	pH inicial	pH final	
0,5	4,6	4,7	93,2
1	4,6	4,6	101,0
2	4,6	4,4	102,1

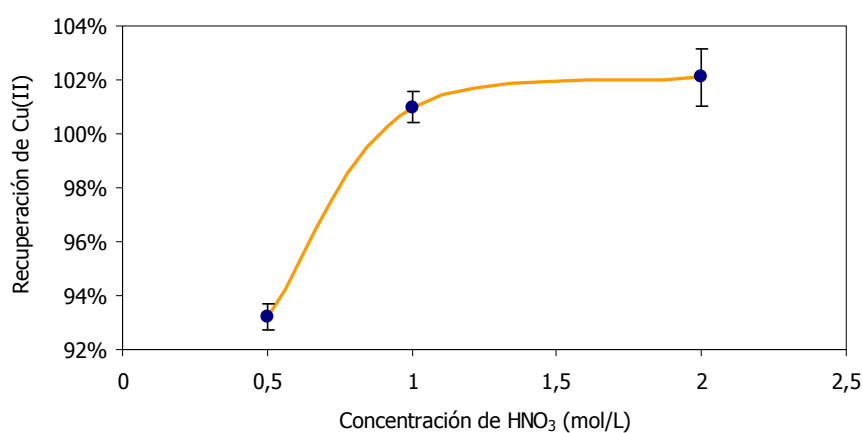


Figura 2.15. Porcentaje de recuperación de Cu(II) ($20\ \mu\text{g}$) con ácido nítrico

Tabla 2.17. Estudio del porcentaje de recuperación de Cu(II) ($20\ \mu\text{g}$) retenido en discos de SDB modificado con PSH ($5\ \text{mg}$) para diferentes concentraciones de ácido clorhídrico ($n=3$; $V_{\text{eluyente}}=10\ \text{mL}$)

Concentración Ácido Clorhídrico (mol/L)	pH de la muestra		% Recuperación
	pH inicial	pH final	
0,5	4,7	4,3	100,7
1	4,5	4,3	101,4
2	4,6	4,4	96,4

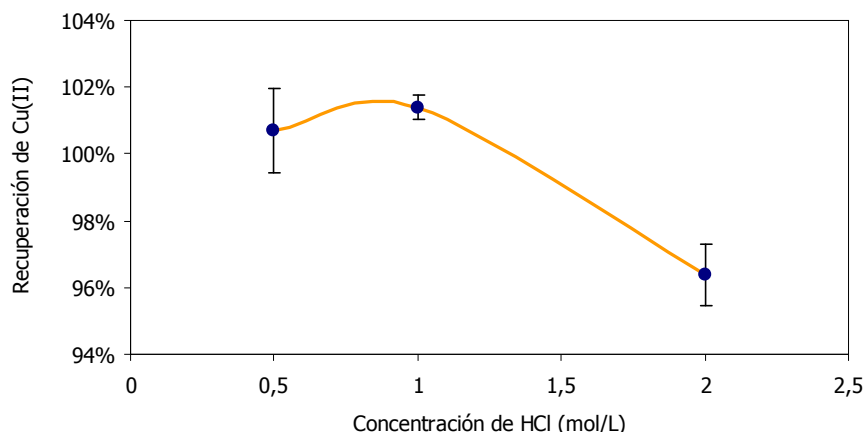


Figura 2.16. Porcentaje de recuperación de Cu(II) (20 μ g) con ácido clorhídrico

2.5.6.2. Estudio del volumen de eluyente en la recuperación del metal

Las pruebas presentadas hasta el momento para el estudio del eluyente se llevaron a cabo con un volumen de 10 mL de cada ácido. En estas condiciones, el proceso de extracción en fase sólida proporciona un factor de preconcentración de 50 unidades. No obstante, por modificación de este volumen se podría incrementar ese factor. Por ello, se pasó a estudiar la influencia del volumen de ácido empleado en la eficacia de la elución.

El procedimiento seguido para este estudio consistió en inmovilizar 5 mg de PSH disueltos en 2,5 mL de metanol y preconcentrar 500 mL de una muestra conteniendo 40 μ g/L de Cu(II) (20 μ g) a pH cercano a 4,5 (controlado con NaOH 0,1 mol/L y/o HNO₃ 0,1 mol/L). El volumen de eluyente se disminuyó a 5 mL, por lo que se podrían obtener factores de preconcentración de 100.

En la Tabla 2.18 se recogen los resultados obtenidos con los dos mejores eluyentes estudiados, utilizando 5 mL de disolución de ácido nítrico o ácido clorhídrico (para concentraciones 0,5, 1 y 2 mol/L). Así, puede observarse cómo eluyendo con 5 mL de HNO₃ 0,5 o 1 mol/L no se llegó a recuperar todo el cobre contenido en la muestra. Sin embargo, si la elución era realizada con ácido clorhídrico 0,5 mol/L, pudo disminuirse el volumen del eluyente a 5 mL y aumentar el factor de preconcentración, pues se obtuvo un valor de recuperación aproximado de 100%.

Como conclusión, se puede decir que 5 mL de HCl 0,5 mol/L fueron suficientes para obtener un factor de preconcentración de 100 unidades, con una recuperación prácticamente del 100%, siendo necesarios, sin embargo, 10 mL de HNO₃ 1-2 mol/L. Dado que el HCl puede, en ciertos casos, presentar interferencias moleculares en la

determinación metálica mediante Espectroscopía de Absorción Atómica [Welz, 1985], que a su vez es una de las técnicas de determinación metálica más usual después de la preconcentración de trazas de metales en una fase ácida, en este trabajo se consideró más interesante utilizar 10 mL de HNO_3 1 mol/L como eluyente para los experimentos posteriores de preconcentración.

Tabla 2.18. Estudio de la eficacia del eluyente utilizado en el porcentaje de recuperación de Cu(II) (20 μg) retenido en discos de SDB modificado con PSH (5 mg) ($n=3$; $V_{\text{eluyente}}=5$ mL)

Ácido	Concentración (mol/L)	pH de la muestra		% Recuperación
		pH inicial	pH final	
5 mL HNO_3	0,5	4,6	4,5	91,7
	1	4,5	4,5	95,7
	2	4,5	4,5	93,7
5 mL HCl	0,5	4,6	4,5	100,3
	1	4,6	4,5	96,8
	2	4,6	4,5	95,7

2.5.6.3. Estudio de la influencia del pH de la muestra sobre la eficacia de la SPE

El pH de la muestra que se desea preconcentrar es un parámetro fundamental en el proceso de extracción en fase sólida y debe de ser optimizado. Por ello se prepararon diferentes disoluciones reguladoras de ácido acético/acetato 4 mol/L de pH 3,5; 4; 4,5; 5 y 5,5; respectivamente para ser utilizadas en la regulación del pH de la muestra. Estas disoluciones tienen la ventaja frente al empleo de NaOH y/o HNO_3 , de controlar mejor el pH para valores moderadamente ácidos, obteniéndose mejor reproducibilidad durante el ajuste del pH de la muestra. Las restantes condiciones del proceso de extracción fueron similares a las ya descritas, utilizando 5 mg de PSH disueltos en 2,5 mL de metanol, un volumen de muestra de 500 mL con 40 $\mu\text{g/L}$ de Cu(II) (20 μg) acondicionada con 50 mL de disolución reguladora 4 mol/L y eluyendo con 10 mL de HNO_3 1 mol/L, ya que la detección se realizó mediante Espectroscopía de Absorción Atómica con llama. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 2.17, donde se ha representado el porcentaje de recuperación obtenido para cada valor de pH estudiado.

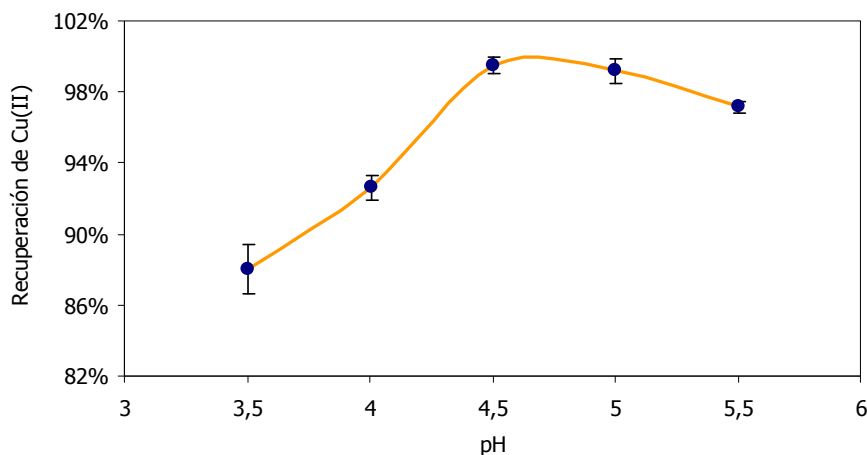


Figura 2.17. Influencia del pH de la muestra en el porcentaje de recuperación de Cu(II) (20 μg) retenido en discos SDB modificado con PSH (5 mg) empleando disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico 0,4 mol/L ($n=3$)

Se puede observar que el máximo de recuperación se encontró para valores de pH próximos a 4,5, por lo que en siguientes experimentos se adicionó disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico de pH 4,5 a las muestras de agua que se desearon preconcentrar, con una concentración final en la muestra de 0,4 mol/L.

2.5.6.4. Estudio de la influencia de la cantidad de reactivo inmovilizado en el disco de membrana SDB

En todas las experiencias realizadas y descritas hasta el momento, se emplearon 5 mg de *saliciloilhidrazona del piridoxal* en 2,5 mL de metanol, los cuales eran inmovilizados en el disco de poliestireno divinilbenceno, favoreciendo la retención del metal de la muestra para su preconcentración.

No obstante, se decidió estudiar si la cantidad de reactivo influía de forma significativa en el sistema de preconcentración. Por ello, se realizaron experiencias por duplicado, de tal forma que se hicieron pasar por el disco diversas cantidades de PSH: 0; 1; 2,5; 5 y 7,5 mg, utilizando volúmenes diferentes de una disolución del reactivo en metanol de 1 mg/mL. Con el primer experimento se evaluó la retención metálica en el disco en ausencia de reactivo y se observó que la recuperación media, para 5 réplicas, se encontraba por debajo del 0,8%. Los resultados se detallan en la Figura 2.18. De este estudio se pudo comprobar que 2,5 mg de reactivo eran suficientes para una recuperación cuantitativa. Por ello, y a

partir de este estudio se decidió utilizar para los siguientes experimentos 2,5 mg de *saliciloilhidrazona del piridoxal*.

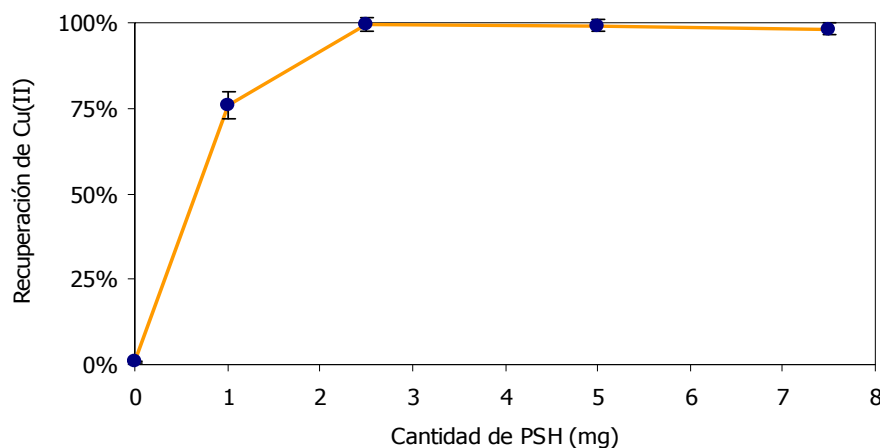


Figura 2.18. Estudio de la influencia de la cantidad de reactivo inmovilizado en el disco SDB sobre el porcentaje de recuperación de Cu(II) ($20\ \mu\text{g}$) tras la SPE

2.5.6.5. Estudio de la influencia de la velocidad de flujo de la muestra y del eluyente durante el proceso de preconcentración de metal

La velocidad de flujo que se aplica para hacer pasar la muestra a través del disco, así como la velocidad con la que se hace pasar el eluyente son dos parámetros importantes en este método, puesto que influyen en la capacidad de retención de los iones Cu(II) en los discos y en su posterior recuperación.

Por este motivo, se estudió la influencia de la velocidad de flujo de la muestra y se encontró que la retención de Cu(II) era cuantitativa y reproducible en un rango de 10-20 mL/min. De esta manera, se seleccionó una velocidad de 10 mL de muestra/min para posteriores experiencias. De igual manera se investigó la velocidad de flujo del eluyente, y se consiguió una extracción cuantitativa en el rango de velocidades de 1-10 mL/min, utilizando 10 mL de ácido nítrico 1 mol/L. Para valores de velocidad superiores, se necesitaron mayores volúmenes de eluyente para alcanzar una recuperación cuantitativa. Por ello, se seleccionó una velocidad de paso de eluyente de 5 mL/min para los siguientes estudios.

2.5.6.6. Optimización de las variables más significativas: Diseño de experimento factorial fraccionario 3^{3-1}

Después del conocimiento previo del sistema mediante su estudio univariante, se realizó una optimización simultánea de las variables más importantes y significativas del sistema. Para seleccionar los valores más adecuados de estas variables se realizó un diseño factorial fraccionario 3^{3-1} incluyendo tres réplicas del experimento del punto central, con lo que se tenían que realizar un total de 11 experimentos. La codificación empleada fue (-1, 0 y +1) para el nivel inferior, intermedio y superior, respectivamente (Tabla 2.19). Los factores fueron el volumen de eluyente, el pH de la muestra y la concentración de eluyente. Los demás parámetros se mantuvieron constantes en los valores que a continuación se detallan:

- Eluyente: HNO_3
- Cantidad de reactivo: 2,5 mg de PSH disueltos en 2,5 mL de metanol
- Velocidad de flujo en la etapa de preconcentración de la muestra: 10 mL/min
- Velocidad de flujo en la etapa de recuperación: 5 mL/min
- Volumen de muestra: 500 mL
- Concentración de Cu en la muestra: 40 $\mu\text{g/L}$

Tabla 2.19. Matriz de las variables del diseño de experimentos 3^{3-1} con los valores codificados

Experimento	Volumen HNO_3 (mL)	pH	Concentración HNO_3 (mol/L)
2	-1	0	+1
5	0	0	0
3	-1	+1	0
8	+1	0	-1
4	0	-1	+1
7	+1	-1	0
6	0	+1	-1
9	+1	+1	+1
1	-1	-1	-1
10	0	0	0
11	0	0	0

Este tipo de diseño factorial permite reducir el número de experiencias a realizar y evaluar eficazmente los factores usando una pequeña fracción de los experimentos del diseño factorial completo [Araujo y Brereton, 1996]. Estos diseños reducidos son adecuados cuando se trabajan con intervalos pequeños para los factores [Figuroa, 2003]. En este tipo de diseños se suelen agregar dos o más observaciones del nivel central de los factores para estimar el error experimental.

En la Tabla 2.20 se pueden observar los tres niveles utilizados para cada una de las variables. La elección de estos valores se realizó en función de los resultados experimentales obtenidos en los estudios univariantes. El tipo de disolución reguladora empleada para estos estudios fue la disolución de AcH/AcNa, con una concentración final en la muestra de 0,4 mol/L. En la Tabla 2.21 se muestran los datos de recuperación obtenidos para cada uno de los experimentos del diseño.

Tabla 2.20. Niveles de las variables del diseño de experimentos 3^{3-1}

Variable	Nivel inferior (-1)	Nivel intermedio (0)	Nivel superior (+1)
Volumen HNO ₃ (mL)	5	10	15
pH muestra	3,5	4,5	5,5
Concentración HNO ₃ (mol/L)	0,5	1	1,5

Tabla 2.21. Eficacia de la extracción en fase sólida para cada experimento del diseño 3^{3-1}

Experimento	Volumen HNO ₃ (mL)	pH	Concentración HNO ₃ (mol/L)	% Recuperación
2	5	4,5	1,5	77,6
5	10	4,5	1	99,4
3	5	5,5	1	70,3
8	15	4,5	0,5	86,5
4	10	3,5	1,5	64,2
7	15	3,5	1	72,8
6	10	5,5	0,5	67,6
9	15	5,5	1,5	73,1
1	5	3,5	0,5	76,2
10	10	4,5	1	99,2
11	10	4,5	1	99,5

Los resultados del diseño de experimento fueron analizados empleando el programa informático Statistica 7 [Statistica, 2004]. En primer lugar, se representó el correspondiente diagrama de Pareto de los efectos estandarizados (Figura 2.19) que incluye la posible dependencia cuadrática o lineal de las variables.

Del diagrama de Pareto se desprende que en el intervalo estudiado para cada una de las variables, la variable significativa (con un nivel de significación $p > 0,05$) en el proceso fue el pH de la muestra teniendo una influencia cuadrática positiva. Con estos resultados, la recuperación de cobre fue máxima en el punto central del intervalo de pH, es decir, para un valor de pH de 4,5. Con respecto a la concentración y volumen del ácido del eluyente, el ácido nítrico, el estudio concluyó que eran dos variables no significativas ($p < 0,05$), pero aún así la dependencia cuadrática de ambas superó, en cuanto al nivel de significación, a la lineal, por lo que se seleccionaron como datos óptimos los valores intermedios de los rangos estudiados: 10 mL de HNO_3 1 mol/L.

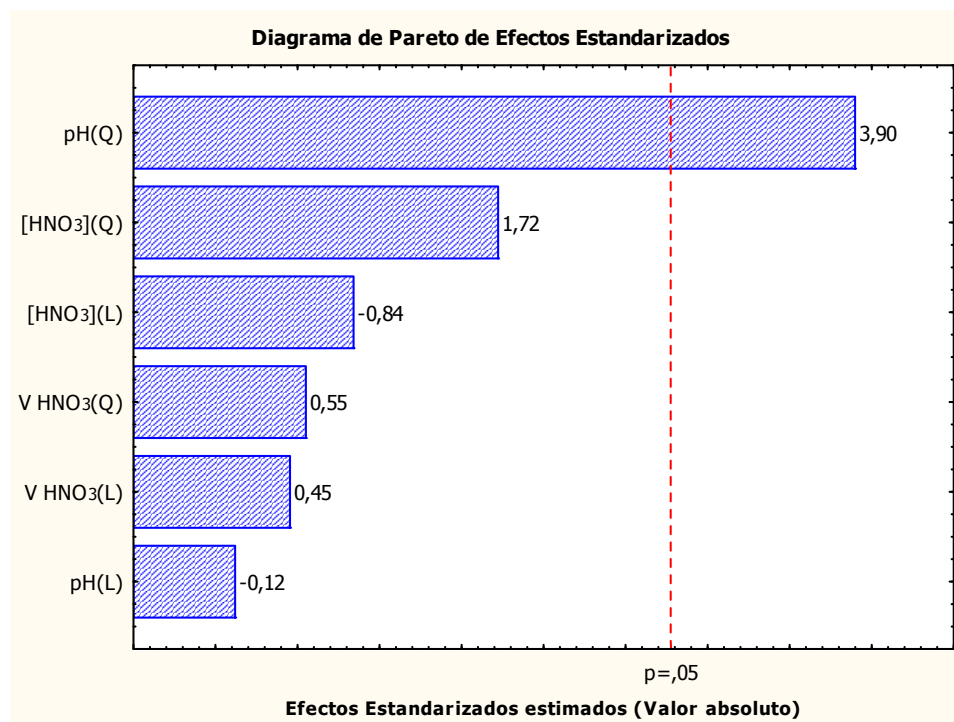


Figura 2.19. Diagrama de Pareto de los efectos estandarizados para la recuperación de Cu(%) tras la preconcentración por SPE

En las Figuras 2.20, 2.21 y 2.22 se representó la superficie de respuesta del modelo producida por el diseño factorial fraccionario para los factores estudiados, combinados de dos en dos.

En la Figura 2.20 se representó el efecto del pH frente al volumen de HNO_3 manteniendo el factor de la concentración de nítrico fijo en el nivel intermedio 0. En el gráfico se puede observar que el punto máximo (100% de recuperación de cobre) se encontró en los valores intermedios de pH y volumen de HNO_3 , lo que equivaldría a pH 4,5 y 10 mL de HNO_3 .

Se representó también el efecto del pH frente a la concentración de HNO_3 , manteniendo constante al nivel codificado 0 el volumen de HNO_3 (Figura 2.21). El punto máximo se encontró alrededor de los valores intermedios de cada factor representado, es decir, pH 4,5 y 1 mol/L de HNO_3 .

Por último, en la Figura 2.22 se pudo observar la respuesta obtenida al variar la concentración de HNO_3 frente a su volumen, manteniendo fijo el pH con el valor intermedio del intervalo. El 100% se consigue con los valores intermedios de los factores representados.

A partir de estas figuras puede comprobarse que las condiciones que permitieron obtener la máxima recuperación de cobre fueron pH 4,5 y 10 mL de HNO_3 1 mol/L, confirmando las condiciones obtenidas en la optimización univariante.

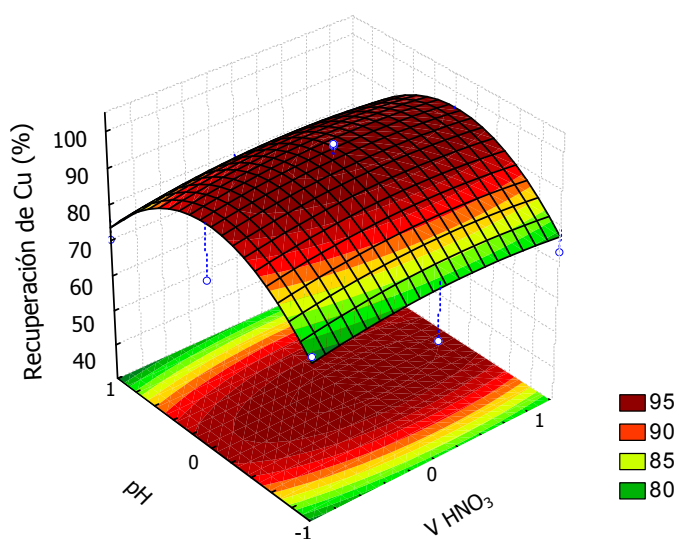


Figura 2.20. Superficie de respuesta del efecto del pH y volumen de HNO_3 sobre la recuperación de Cu (%) (Nivel del factor $[\text{HNO}_3]=0$)

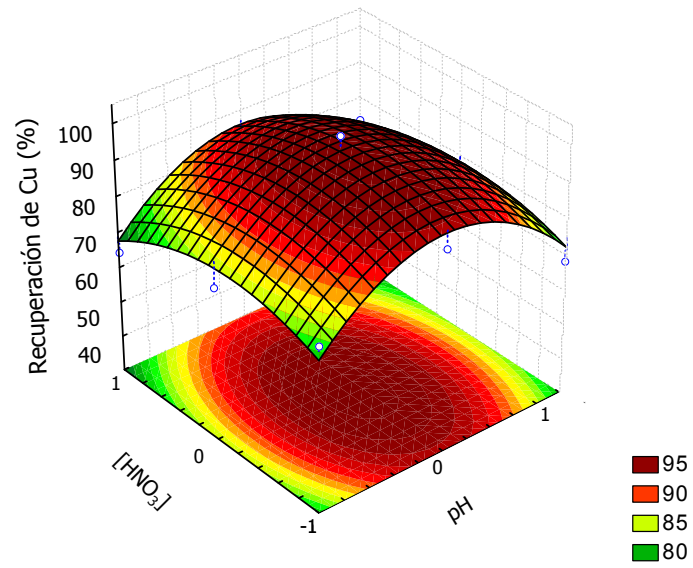


Figura 2.21. Superficie de respuesta del efecto de la concentración de HNO_3 y el pH sobre la recuperación de Cu (%) (Nivel del factor $V_{\text{HNO}_3} = 0$)

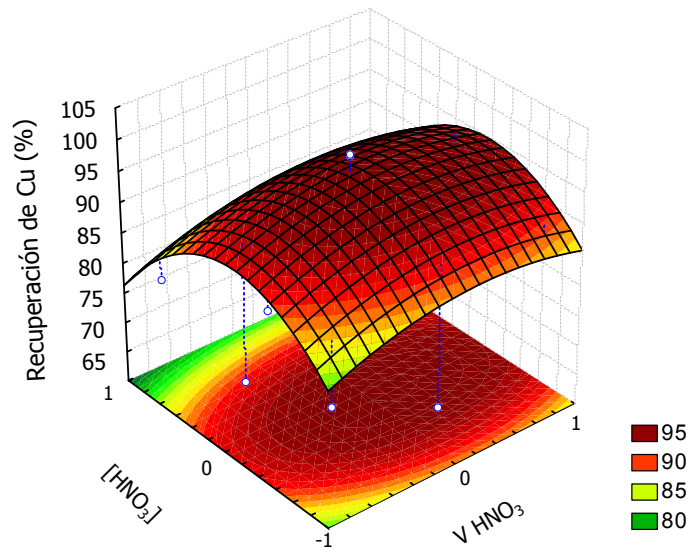


Figura 2.22. Superficie de respuesta del efecto de la concentración y volumen de HNO_3 sobre la recuperación de Cu (%) (Nivel del factor $\text{pH} = 0$)

2.5.7. Características analíticas del método propuesto para la extracción en fase sólida de iones Cu(II) en aguas naturales

Concluida la optimización, se propuso el método de preconcentración de trazas de cobre en muestras acuosas mediante extracción en fase sólida con PSH inmovilizada en discos de membrana de poliestireno divinilbenceno. A continuación, en la Tabla 2.22 se detallan las condiciones óptimas del método.

Tabla 2.22. Condiciones óptimas del método de SPE con discos modificados con PSH para la preconcentración y separación de trazas de Cu(II)

Variables	Valores
Naturaleza del eluyente	HNO ₃ 1 mol/L
Volumen de eluyente	10 mL
pH de la muestra	4,5
Disolución reguladora	AcH/AcNa 0,4 mol/L
Cantidad de PSH inmovilizada	2,5 mg disueltos en 2,5 mL de metanol
Velocidad de flujo en la etapa de extracción de la muestra	10 mL/min
Velocidad de flujo en la etapa de recuperación del metal	5 mL/min

Posteriormente se estudiaron los parámetros analíticos que lo caracterizan: reutilización del disco, capacidad máxima, volumen máximo de muestra, rango dinámico de aplicación (linealidad), límite de detección y cuantificación, y la precisión del método. Para finalizar se estudiaron las interferencias de iones mayoritarios y minoritarios presentes en las aguas naturales y de otros iones metálicos traza.

2.5.7.1. Reutilización y capacidad máxima del disco

La reutilización del disco es un parámetro importante en la metodología de extracción en fase sólida que utiliza esta configuración, puesto que indica cuántas experiencias pueden realizarse sobre un mismo disco tras ser descontaminado. El estudio de la reutilización se llevó a cabo mediante la medida de la recuperación de cobre durante varios ciclos. Se observó que el disco modificado con 2,5 mg de PSH podía ser utilizado al menos 20 veces, sin cambios en el porcentaje de recuperación del metal ($99,8 \pm 1,2\%$). Esto

indica que el disco modificado con PSH presenta una buena reutilización para usos continuados.

Igualmente, se determinó la capacidad máxima del disco modificado con 2,5 mg de PSH haciendo pasar a través del disco 500 mL de muestra que contenía 350 μg de cobre (cantidad estequiométrica máxima de Cu que puede formar complejo con 2,5 mg de PSH), a pH 4,5 y midiendo posteriormente por FAAS. La capacidad máxima del disco, para 3 réplicas, fue $65,6 \pm 2,1$ μg de cobre, debido probablemente a la obturación del disco por la elevada cantidad de complejo retenido.

2.5.7.2. Volumen máximo de muestra

Como se ha explicado anteriormente, la saliciloilhidrazona del piridoxal es un reactivo orgánico poco soluble en agua. Su límite de solubilidad es de 0,6 g en 1 L. Si se supera este valor, la PSH no se disuelve. Sin embargo, si se pone en contacto con una cantidad considerable de agua, es susceptible de sufrir una disolución parcial. En el método que se ha desarrollado es fundamental que el reactivo se encuentre retenido en el disco durante el proceso completo de extracción. En el caso de que éste se disuelva al hacer pasar la muestra acuosa, la recuperación de Cu(II) podría no ser cuantitativa.

Por este motivo, es de vital importancia estudiar el máximo volumen de muestra que se puede tratar en el proceso de preconcentración por extracción en fase sólida con el método propuesto, sin que se produzca una pérdida significativa del reactivo inmovilizado y con ello se reduzca el rendimiento del método.

Así, se realizaron diferentes experiencias variando el volumen de muestra con las condiciones definidas para el método propuesto. En todos los casos la cantidad de Cu(II) permaneció constante, con un valor de 5 μg , con lo que el factor de preconcentración fue variando; únicamente se modificó el volumen total de disolución, siendo por tanto las muestras cada vez más diluidas al incrementarse el volumen de muestra. En la Tabla 2.23 se detallan los resultados obtenidos. Puede observarse que volúmenes de muestra de 2 litros produjeron una disminución en la recuperación del metal, probablemente debido a una pérdida de retención del reactivo y/o del complejo metálico en el disco de membrana. Por este motivo, el volumen máximo de muestra recomendado para emplear fue de 1000 mL, dando lugar a un factor de preconcentración de 100 veces.

Tabla 2.23. Influencia del volumen de muestra en la recuperación de Cu(II) (5 µg) aplicando el método de preconcentración por SPE con discos modificados con PSH

Volumen de muestra (mL)	Concentración de Cu(II) (µg/L)	% Recuperación
50	100	99,4
100	50	99,8
250	20	99,9
500	10	101,7
1000	5	102,2
2000	2,5	39,5

2.5.7.3. Curva de calibrado

Uno de los parámetros que se precisan definir cuando se desarrolla un nuevo método analítico es su rango lineal de aplicación. Para establecer el intervalo de linealidad del método, se prepararon por duplicado diferentes muestras sintéticas a las que se les adicionó Cu(II) a las concentraciones usuales en las que se suele encontrar este metal en las aguas naturales: 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 µg/L. Los parámetros utilizados fueron los optimizados y detallados en la Tabla 2.22. El volumen de muestra que se preconcentró fue en todos los casos de 500 mL.

Los resultados que se obtuvieron fueron prácticamente del 100% de recuperación, para las muestras estudiadas en el intervalo de 1 a 60 µg/L, dando una respuesta lineal para la determinación de Cu(II). Este intervalo fue considerado muy adecuado para el análisis de cobre en muestras de aguas naturales. El coeficiente de regresión (para n=10) y la ecuación de regresión lineal fueron: $R^2=0,9982$ y Absorbancia ($\lambda=324,8$ nm) = $0,0047[\text{Cu(II)} (\mu\text{g/L})] + 0,0038$ (Figura 2.23).

Para muestras con concentraciones superiores (a partir de 80 µg/L) la recuperación comenzó a disminuir en un 15%, debido probablemente a la saturación del disco de membrana. No obstante, el método resulta interesante para muestras de baja concentración, y en caso de aplicarlo con objeto de eliminar la matriz de la muestra se puede aplicar utilizando menor volumen de muestra, lo que impediría la saturación de la membrana al disminuir la cantidad de metal a preconcentrar.

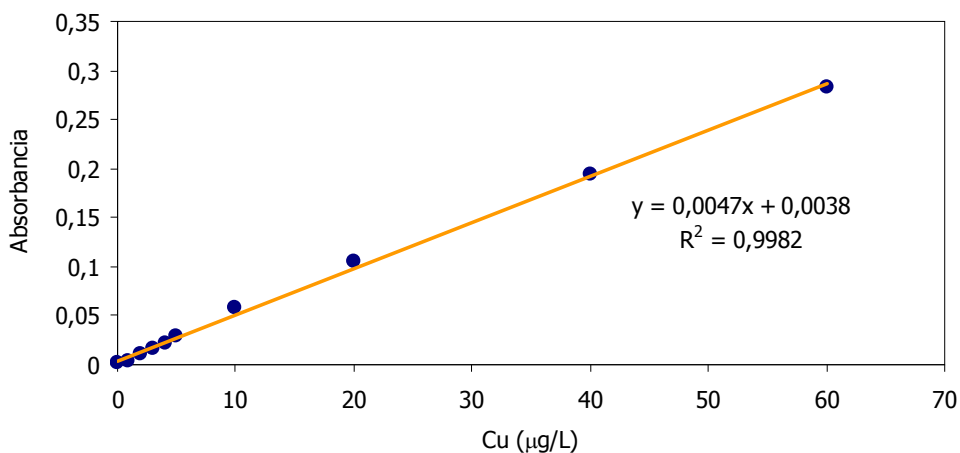


Figura 2.23. Recta de calibrado para concentraciones de cobre de 1 a 60 µg/L aplicando el método de separación y preconcentración propuesto por SPE con discos modificados con PSH

2.5.7.4. Límite de detección y cuantificación

El límite de detección se calculó de acuerdo con la definición de la IUPAC [IUPAC, 1997], según la cual

$$L.D. = 3\sigma/m \quad (2.9)$$

donde σ es la desviación estándar del blanco y m la pendiente de la recta de regresión (Figura 2.23). El valor de ese límite se estimó para 5 réplicas del blanco (utilizando agua desionizada Milli-Q sin metal), tras ser preconcentrado con el método propuesto y analizado por FAAS. De esta forma, se obtuvo un límite de detección de 4 ng/L de Cu(II).

Igualmente, se evaluó el límite de cuantificación definido como $L.C. = 10 \sigma/m$ [IUPAC, 1997] y se obtuvo un L.C. de 14 ng/L de Cu(II).

2.5.7.5. Reproducibilidad del método

Para estudiar la reproducibilidad del método de análisis de Cu por el método de SPE propuesto se realizaron diez análisis diferentes en las condiciones óptimas obtenidas, sobre una muestra de agua con una concentración de metal de 40 µg/L y se calculó la eficacia de la preconcentración (%).

Para calcular el valor de la distribución t se tuvo en cuenta los grados de libertad del sistema $n-1=9$ (siendo n el número de experimentos realizados) y se aceptó un intervalo de confianza del 95%. Así, para 9 grados de libertad y un intervalo de confianza del 95%, el valor de t tabulado es 2,262.

Con estos datos se pudo calcular el valor de la precisión del método a partir de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ error} = \frac{s \cdot t}{\bar{x} \cdot \sqrt{n}} \cdot 100 \quad (2.10)$$

donde s es la desviación estándar de las medidas, t el valor de la distribución t tabulado, \bar{x} el valor medio de los resultados obtenidos y n el número de repeticiones.

La desviación estándar se calculó según la expresión:

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (2.11)$$

La desviación estándar relativa (RSD) se calculó de la siguiente manera:

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100 \quad (2.12)$$

La media de los diez experimentos fue del 99,0 % con una desviación estándar de 2,1. A partir de estos valores, se obtuvo la precisión del método que fue del 1,5% (para un 95% de intervalo de confianza). Esta reproducibilidad obtenida en el proceso de transporte fue muy satisfactoria, confirmando las adecuadas características analíticas del método propuesto. Como puede comprobarse, el promedio de recuperación en estos 10 experimentos fue ligeramente inferior al obtenido en las 20 experiencias realizadas para estudiar la reutilización del disco (99,8%). Esto puede deberse a que para el estudio de reproducibilidad se utilizaron discos diferentes, mientras que para el estudio de reutilización, se utilizó el mismo disco para todas las experiencias.

En las Tablas 2.24 y 2.25 se muestran los datos obtenidos para la concentración de Cu(II) y el porcentaje de recuperación encontrado, respectivamente, incluyendo la desviación estándar (s), desviación estándar relativa (RSD) y la precisión del método. La concentración promedio encontrada fue de 39,6 $\mu\text{g/L}$, siendo el margen de concentraciones obtenido durante la determinación de Cu(II) de 38,8 hasta 40,4 $\mu\text{g/L}$.

Tabla 2.24. Reproducibilidad de la concentración obtenida en el análisis de Cu mediante el método de separación y preconcentración propuesto por SPE con discos modificados con PSH

Parámetros	Valores
Concentración de Cu(II) (µg/L)	38,5; 39,8; 40,5; 39,7; 38,4; 39,19; 39,4; 40,5; 40,9; 39,4
n	10
Grados de libertad (n-1)	9
Intervalo de confianza	95%
t	2,262
Media	39,6
s	0,8
RSD (%)	2,1
Precisión (%)	1,5

Tabla 2.25. Reproducibilidad de la recuperación obtenida en el análisis de Cu mediante el método de separación y preconcentración propuesto por SPE con discos modificados con PSH

Parámetros	Valores
Recuperación (%)	97,0; 99,5; 101,2; 99,2; 96,0; 98,0; 98,4; 101,3; 102,2; 98,4
n	10
Grados de libertad (n-1)	9
Intervalo de confianza	95%
t	2,262
Media	99,0
s	2,1
RSD (%)	2,1
Precisión (%)	1,5

2.5.7.6. Interferencias del método de separación y preconcentración de Cu(II) por SPE con discos modificados con PSH

Dado que se pretende aplicar el método propuesto a muestras de aguas, como agua de mar, es importante estudiar el efecto que podrían producir los elementos presentes en este tipo de muestras. Dichos elementos podrían influir tanto en la retención del ligando en el disco de membrana, como en la formación y posterior elución del complejo Cu-PSH. En aguas naturales están presentes diferentes iones mayoritarios en forma de sales, sobre todo en el caso de muestras de agua de mar, y ciertos metales que podrían tener afinidad con el ligando orgánico utilizado. Es por ello que se estudiaron las interferencias tanto salinas como metálicas en la separación y preconcentración de Cu(II) por extracción en fase sólida.

Se prepararon diferentes disoluciones conteniendo una concentración de Cu(II) de 40 µg/L y se procedió a adicionar cada uno de los metales y las sales más frecuentes que constituyen la matriz del agua de mar, por ser sus concentraciones superiores a la de las restantes sales presentes en el resto de aguas naturales.

2.5.7.6.1. Efecto de los iones mayoritarios y minoritarios presentes en agua de mar

Se ha evaluado la influencia de distintas sales inorgánicas en la extracción en fase sólida de Cu con PSH. La composición cuantitativa de las sales en agua de mar puede verse alterada en función de la localización y características de la zona; aún así, la composición cualitativa y las relaciones de concentración pueden considerarse aproximadamente constante. Por ello, se estudió el efecto que producen estas especies iónicas a los niveles de concentración que se encuentran en aguas de mar de salinidad 35 g/L. En la Tabla 2.26 se detalla la naturaleza y concentración de cada una de las sales, según las indicaciones de Grasshoff y colaboradores, en agua de mar [Grasshoff y col., 1983].

Se prepararon distintas muestras sintéticas conteniendo Cu(II) 40 µg/L y una sal a la concentración que se detalla en la Tabla 2.26. Las sales utilizadas fueron de calidad Suprapur, excepto $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ por no estar comercializadas. Las demás condiciones experimentales son las recogidas en la Tabla 2.22. El ión cobre preconcentrado fue analizado después de la aplicación de la extracción en fase sólida por espectroscopía de absorción atómica con llama.

Los resultados obtenidos para el estudio de estas especies interferentes se resumen en la Tabla 2.27. Como se indica, los porcentajes de recuperación obtenidos fueron aproximadamente del 100% y el intervalo de concentración de metal preconcentrado fue

de 38,7 a 41,1 $\mu\text{g/L}$, quedando dentro del rango ofrecido por la precisión del método y expuesto en el apartado anterior.

Tabla 2.26. Composición salina de las muestras utilizadas para el estudio de las interferencias del método de SPE debidas a sales inorgánicas

Especie interferente		Concentración en la disolución de ensayo (g/L)
Iones en la disolución	Sal	
Na^+ , Cl^-	NaCl	23,939
Mg^{2+} , Cl^-	$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10,825
Na^+ , SO_4^{2-}	Na_2SO_4	3,994
Ca^{2+} , Cl^-	$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,704
K^+ , Cl^-	KCl	0,677
Na^+ , HCO_3^- , CO_3^{2-}	NaHCO_3	0,196
K^+ , Br^-	KBr	0,098
H_2BO_3^- , HBO_3^{2-} , BO_3^{3-}	H_3BO_3	0,027
Sr^{2+} , Cl^-	$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,024
Na^+ , F^-	NaF	0,003

Tabla 2.27. Eficacia de la separación y preconcentración de Cu(II) (40 $\mu\text{g/L}$) por SPE en presencia de las sales inorgánicas presentes en el agua de mar

Especie interferente	[Cu] ($\mu\text{g/L}$) encontrado	% Recuperación
NaCl	39,8	99,3
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	38,7	96,7
Na_2SO_4	39,8	99,6
$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	40,0	100,1
KCl	39,4	98,5
NaHCO_3	39,8	99,4
KBr	40,3	100,8
H_3BO_3	41,1	102,7
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	39,7	99,3
NaF	40,3	100,8

Por lo tanto, no se ha observado la existencia de interferencias significativas procedentes de las sales más abundantes en agua de mar, por lo que el método puede ser aplicado a matrices de este tipo y con concentraciones inferiores, como podrían ser agua de río, de lago o de lluvia.

2.5.7.6.2. Efecto de la presencia de iones de metales pesados presentes en agua de mar

Otro grupo principal de interferencias lo constituye la existencia de diversos metales en disolución que también pueden presentar afinidad por la formación de complejo con la PSH y que, por tanto, puedan competir con el Cu(II) en el proceso de formación del complejo Cu(II)-PSH.

Para estudiar la influencia de estas especies interferentes, se prepararon muestras sintéticas conteniendo 40 µg/L de Cu(II) y se adicionaron diversos iones metálicos que podrían formar complejo con el ligando PSH.

Las concentraciones de estos metales se seleccionaron de acuerdo con los niveles a los que se encuentran presentes en el agua de mar natural. Estos niveles se recogen en la Tabla 2.28 [Crompton, 2007].

Tabla 2.28. Concentraciones de metales (nmol/L y µg/L) usuales en agua de mar [Crompton, 2007]

Metal	Aguas costeras		Aguas oceánicas	
	(nmol/L)	(µg/L)	(nmol/L)	(µg/L)
Al(III)	237,2 - 2335	6,40 - 63,0	3,71 - 22,24	0,10 - 0,60
Fe(III)	17,91 - 4476	1,0 - 250,0	3,58 - 5766	0,20 - 320
Mn(II)	6,37 - 4551	0,35 - 250,0	0,33	0,018
Ni(II)	3,41 - 90,79	0,20 - 5,33	2,55 - 15,84	0,15 - 0,93
V(V)	0,20 - 100	0,01 - 5,1	8,83 - 39,26	0,45 - 2,00
Zn(II)	0,11 - 3059	0,007 - 200,0	0,76 - 167	0,05 - 10,9
Pb(II)	0,18 - 35,91	0,038 - 7,44	0,0002 - 43,43	$4 \cdot 10^{-5}$ - 9,00
Bi(III)	0,00024 - 3,25	$5 \cdot 10^{-5}$ - 0,68	$<1,4 \cdot 10^{-5}$ - $2,4 \cdot 10^{-5}$	$<3 \cdot 10^{-6}$ - $5 \cdot 10^{-6}$
Cd(II)	0,13 - 44,48	0,015 - 5,0	0,089 - 1,12	0,01 - 0,13
Co(II)	<0,17 - 4,24	<0,01 - 0,25	0,051 - 2,72	0,003 - 0,16

En primer lugar, se eligieron aquellos metales que suelen aparecer en mayor concentración en aguas naturales: Al(III), Fe(III), Mn(II), Ni(II), V(V) y Zn(II), que fueron estudiados para una concentración de 100 nmol/L. Se estudió también el Pb(II) con una concentración de 30 nmol/L, y por último, se estudiaron las interferencias de Bi(III), Cd(II), Co(II) y Tl(I) a una concentración de 3 nmol/L, como subtrazas, pues en las aguas no suelen encontrarse a mayores concentraciones. Las disoluciones de metal de 100, 30 y 3 nmol/L se prepararon por dilución a partir de las correspondientes disoluciones patrones comerciales de 1000 mg/L (Merck, Alemania).

Los resultados se han detallado en la Tabla 2.29. Como puede observarse, todos los porcentajes de recuperación se encontraron en torno al 100%, y además los valores de concentración de Cu(II) recuperado estuvieron dentro de intervalo de precisión del método.

Puede concluirse, por tanto, que no se hallaron efectos interferentes significativos por causa de los iones metálicos a los niveles característicos presentes en agua de mar.

Tabla 2.29. Efecto de las sustancias interferentes en el análisis de Cu(II) (40 µg/L) por SPE

Especie interferente	Concentración de la especie		Cu:Metal (µg/L: µg/L)	[Cu] (µg/L) encontrado	% Recuperación
	(nmol/L)	(µg/L)			
Al(III)	100	2,70	14,8	39,7	99,2
Fe(III)	100	5,58	7,2	40,6	101,1
Mn(II)	100	5,49	7,3	39,9	99,8
Ni(II)	100	5,87	6,8	39,7	99,3
V(V)	100	5,09	7,9	40,2	100,5
Zn(II)	100	6,54	6,1	39,7	99,2
Pb(II)	30	6,22	6,4	39,8	99,6
Bi(III)	3	0,63	63,5	39,7	99,2
Cd(II)	3	0,34	117,6	40,5	101,2
Co(II)	3	0,18	222,2	39,9	99,7
Tl(I)	3	0,61	65,6	39,8	99,4

2.5.8. Validación del método de Extracción en Fase Sólida

El análisis de muestras medioambientales, como aguas naturales (continentales o marinas), presenta la dificultad de que su composición puede ser muy compleja debido a las diversas sustancias que conforman su naturaleza. Esta matriz puede influir en la calidad de los resultados e influir en la exactitud del método de análisis que se emplee. Para evaluar este parámetro, se suele realizar la simulación en el laboratorio de la composición química de los diferentes tipos de muestras acuosas procedentes de ecosistemas naturales, aunque no resulta una tarea sencilla. Dos métodos que se suelen utilizar con frecuencia para validar un método, consisten en la elaboración y análisis de muestras sintéticas y en el análisis de materiales de referencia certificados. No obstante, el grado de adecuación y similitud de las muestras artificiales con las muestras naturales es, a veces, hasta cierto punto limitado y la elaboración no siempre es fácil. Resulta más adecuado el empleo de materiales certificados cuyo contenido ha sido previamente validado.

El método de determinación de Cu(II) por SPE empleando PSH ha sido validado analizando el contenido de Cu(II) total disuelto en una muestra certificada de agua de lago: TM-DWS.2, suministrada por LGC Promochem SL (España) y en dos muestras reales de agua de mar.

La muestra certificada es un agua preparada a partir de dilución y filtración de agua del Lago Ontario (Canadá), y preservada con 0,2% de ácido nítrico. Presenta valores certificados para Ag, Al, As, B, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Li, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Sb, Sn, Sr, Tl, Ti, U, V y Zn, siendo el valor certificado para Cu(II) de 168 µg/L.

Las muestras reales de agua de mar fueron recogidas en la costa de Huelva mediante un tubo de teflón (tubo 6429-25 de Cole-Parmer Instrument Co. Illinois U.S.A) acoplado a una bomba peristáltica (Masterflex 7521-00, cabezal 07518-10, Cole-Parmer (EE.UU.)) siguiendo el protocolo *manos limpias-manos sucias*. Este protocolo requiere la colaboración de tres personas: una de ellas debe sostener una pértiga telescópica de 4 m a la que se sujeta el tubo de teflón, y su cometido es el de mantener el extremo de entrada de agua en las aguas superficiales y lo más lejos posible de la embarcación para que la muestra no se vea afectada por la contaminación emitida por el motor; las otras dos personas son las encargadas de realizar la toma de muestra propiamente dicha.

La primera de ellas, *manos sucias*, debe sostener el extremo de salida del agua y facilitar el material que va a ser utilizado en cada momento, así como realizar las operaciones de encendido y apagado de la bomba peristáltica empleada para succionar el agua. La otra persona, *manos limpias*, debe mantener el mínimo contacto con todo el material del barco y sólo toma los recipientes en los que se va a recoger la muestra utilizando dobles guantes de plástico en todo momento.

Las muestras de agua se filtraron in situ a través de filtros de membrana de 0,45 micras de tamaño de poro conectados en línea con la bomba y el recipiente recolector. El agua se depositó en las botellas de toma de muestra, que se cerraron e introdujeron en dos bolsas de plástico de cierre hermético. Las botellas se conservaron en neveras de plástico refrigeradas con bloques de hielo hasta su llegada al laboratorio. Una vez allí, se acidificaron con HNO_3 (calidad Suprapur, Merck (Alemania)) hasta una concentración de 2 mL/L. Se dejaron aproximadamente dos semanas a temperatura ambiente para que el ácido pudiera lixiviar los metales que pudieran haberse adsorbido en las paredes del recipiente de plástico antes de ser congeladas para su conservación a -20°C hasta su análisis.

Previamente a la aplicación del método, las muestras de agua fueron digeridas durante 2 horas en tubos de cuarzo con un digestor de UV (Equipo Metrohm 705 UV Digester) con la adición de 50 μL de H_2O_2 para eliminar la interferencia de la materia orgánica que pudiera estar complejando el metal.

En la Tabla 2.30, se recogen los resultados de concentración de Cu(II) obtenidos mediante el método propuesto, tanto para la muestra de referencia como las de agua de mar reales. Los resultados se compararon con el valor verdadero de concentración de Cu(II), que en el caso de la muestra de referencia se corresponde con el valor certificado, mientras que en las muestras reales se corresponde con el valor calculado mediante un segundo método considerado de referencia, que fue la Voltamperometría de Redisolución Anódica (VA Application Bulletin No. 231/2, B12916, Metrohm).

Tabla 2.30. Concentración de Cu encontrado en muestras de agua reales y certificadas mediante el método propuesto de SPE ($n=2$) y por ASV ($n=4$) o su valor certificado

Muestra	Concentración de Cu(II) ($\mu\text{g/L}$)	Cu(II) encontrado por el método propuesto ($\mu\text{g/L}$)	Error Relativo (%)
TM-DWS.2	$168 \pm 7,1^a$	$172,7 \pm 2,3$	2,8
Agua de mar 1	$13,83 \pm 0,51^b$	$13,97 \pm 0,28$	1,0
Agua de mar 2	$26,11 \pm 0,63^b$	$26,49 \pm 0,12$	1,5

^a Valor certificado de la muestra de referencia; ^b Cu medido por ASV

Como se puede comprobar, los errores relativos para cada una de las muestras (calculados teniendo en cuenta la diferencia entre el valor de la medida y el valor tomado como exacto dividido entre el valor exacto), son relativamente bajos, todos por debajo del 5%, indicándonos la fiabilidad de los resultados. De esta manera, se ha comprobado la

exactitud del método propuesto, justificándose su adecuación para su aplicación en muestras de aguas naturales como agua de mar.

Una de las propiedades más importantes de un método analítico es que debería estar libre de errores sistemáticos. Es decir, el valor dado para la cantidad de analito debería ser el valor verdadero. Sin embargo, incluso si no existieran errores sistemáticos, los errores aleatorios hacen poco probable que la cantidad medida sea exactamente igual que la cantidad conocida. Por lo que, para decidir si la diferencia entre ambas cantidades se puede atribuir a errores aleatorios se debe emplear algún contraste de significación.

Para validar el método propuesto mediante muestras de referencia, el contraste de significación se realiza mediante la *comparación de una media experimental con un valor conocido* [Miller, 2002].

En primer lugar se debe establecer la hipótesis nula H_0 , en la que se considera que el método analítico no está sujeto a errores sistemáticos, es decir, que no existe diferencia significativa entre el valor observado y el conocido.

Para decidir si la diferencia entre la media experimental y el valor verdadero es significativa, es decir, para contrastar H_0 , se calcula el estadístico t:

$$t = \frac{(\bar{x} - \eta) \cdot \sqrt{n}}{s} \quad (2.13)$$

donde \bar{x} es la media muestral, η es la media de la población, s la desviación estándar muestral y n el número de muestras.

Para la muestra de referencia, se tiene el valor certificado de cobre (η) y para los análisis replicados obtenidos por el método propuesto, se tiene la media (\bar{x}) y la desviación estándar (s). Al sustituir estos valores en la expresión de la *t de Student*, se obtiene el valor de *t calculada*:

$$t = \frac{(172,68 - 168) \cdot \sqrt{2}}{2,30} = 2,88$$

Si el valor absoluto de la *t calculada* es mayor que un cierto valor crítico, entonces se rechaza la hipótesis nula. El valor crítico de la *t de Student* para el contraste de dos colas con un 5% de probabilidad y 1 grado de libertad está tabulado y vale $t=12,706$. En este caso, se obtuvo una *t calculada* menor que la tabulada, por lo que se acepta la hipótesis nula, lo que significa que no hay evidencia de error sistemático, o lo que es lo mismo la diferencia observada no es estadísticamente significativa.

Para el caso de las muestras reales, el contraste de significación empleado para evaluar la exactitud del método fue la *comparación de dos medias experimentales* [Miller, 2002], empleando los resultados obtenidos mediante el método propuesto y aquellos

obtenidos usando el método de referencia. En este caso, el estadístico t y la s se calculan utilizando las siguientes expresiones (se ha considerado la condición de que las dos desviaciones individuales no son significativamente diferentes, por lo que se puede calcular una estimación conjunta de la desviación estándar):

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}} \quad s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{(n_1 + n_2 - 2)} \quad (2.14)$$

En este caso se tienen dos medias muestrales y la hipótesis nula incluye la igualdad entre las medias. El número de grados de libertad del estadístico t es igual a $(n_1 + n_2 - 2)$. En este caso, el número de grados de libertad fue de 4, puesto que se realizaron dos análisis de Cu(II) por el método propuesto y cuatro por el método de referencia. El valor de t tabulado para el contraste de dos colas es de 2,776. Los valores absolutos observados para el estadístico t fueron de 0,378 y 0,804, para cada muestra. Puesto que ambos valores son inferiores al t tabulado se acepta la hipótesis nula y puede decirse que ambos métodos proporcionan el mismo resultado y son significativamente iguales.

2.5.9. Comparación del método propuesto con otros descritos en la bibliografía

El cobre es un metal traza, que se encuentra en la naturaleza ampliamente distribuido, tanto en el suelo como en el agua, aire y biosfera. Puede presentarse bien como elemento nativo, o integrando numerosos compuestos como óxidos o hidróxidos, sulfato de hierro y cobre o carbonato cúprico. El interés por determinar el efecto que el cobre puede producir sobre los procesos biológicos ha provocado una gran demanda de metodologías analíticas que puedan proporcionar determinaciones de Cu sensibles, rápidas y precisas.

Por ello, se ha desarrollado un método de extracción en fase sólida y se ha comparado con otros en la bibliografía que abordan el análisis de Cu en muestras de aguas naturales. En la Tabla 2.31 se han incluido estos métodos y además se ha descrito el material soporte seleccionado, el ligando, el límite de detección, el factor de preconcentración, el rango de aplicación y las muestras a las que se ha aplicado el método. La mayoría de estos métodos fueron aplicados a muestras no salinas (agua de río, mineral, de manantial, de grifo o aguas de lluvia).

Tabla 2.31. Métodos descritos por la bibliografía para la determinación de Cobre mediante extracción en fase sólida con discos de membrana en muestras de aguas

Soporte sólido	Ligando	L.D. (µg/L)	Factor de preconcentración	Rango	Aplicación [Ref]
Disco C ₁₈	5-Ter-butil-2-hidroxibenzaldehído oxima	0,25	400	2,5 -2847,2 µg/L	Agua de grifo, agua de manantial y agua de mar [Dindar, 2010]
	3,5- di-ter-butil-2-hidroxibenzaldehído oxima	0,29	400	2,5 – 3825 µg/L	
Disco C ₁₈	Bis(5-bromo-2-hidroxibenzaldehído)-1,2-propanodiimina	0,0024	400	0,1 – 80 µg/L	Nieve, agua de grifo y agua mineral [Fathi, 2009]
Disco C ₁₈	Aza-tioéter corona	0,08	200		Muestras de agua sintéticas [Moghimi, 2009]
Disco C ₁₈	bis-(3-metoxi salicilaldehído)-1,6-diaminohexano	0,03	100	1- 150 µg/L	Agua de río, orina, sangre, suero y aleaciones [Mashhadizadeh, 2008b]
Disco C ₁₈	N,N'-disalicilidenoetilendiamina	0,005	500		Agua de grifo, nieve, agua de lluvia y agua de mar [Moguimi, 2007a]
Disco C ₁₈	1,5-difenilcarbazida	0,005	400		Agua de grifo, nieve, agua de lluvia y agua de mar [Moguimi, 2007b]
Disco C ₁₈	4-(4-clorofenilazo)-2-[(4-hidroxifenilamino) metil]fenol	0,20		1-80 µg/L	Agua natural [Mashhadizadeh, 2006]
Disco C ₁₈	3,6,9,14-tetratiabicclo [9.2.1] tetradeca-11,13-dieno	5			Muestras de agua, minerales y productos metalúrgicos [Mollaei, 2005]

Tabla 2.31 (cont.). Métodos descritos por la bibliografía para la determinación de Cobre mediante extracción en fase sólida con discos de membrana en muestras de aguas

Soporte sólido	Ligando	L.D. (µg/L)	Factor de preconcentración	Rango	Aplicación [Ref]
Disco C ₁₈	1-hidroxi-2-(prop-2'-enil)-4-(prop-2'-enioxil)-9,10-antraquinona	0,1	400		Agua sintética [Shamsipur, 2004]
Disco C ₁₈	bis(2-hidroxifenilamino) glioxima	0,004	100		Agua de grifo, aguas de desecho [Ghiasvand, 2004]
Disco C ₁₈	3-{2-[2-(2-hidroxiimino-1-metil-propilidenamino)-etilamino]-etilimino}-butan-2-ona oxima	0,17	300 para todas las muestras excepto 200 para agua de mar		Agua de grifo, nieve, río, manantial, mineral y agua de mar [Dalman, 2003]
Disco C ₁₈	bis-2-tiofenol propandiamina	0,02	500		Agua sintética, de río y agua de desecho [Ganjali, 2003]
Disco C ₁₈	1, 8-bis (salicilaldiminato) - 3, 6-dioxaoctano	0,2			Aguas de desecho [Ganjali, 2002a]
Disco C ₁₈	N,N'-bis(salicilideno) etilendiamina	0,04			[Ganjali, 2002b]
Disco C ₁₈	11-hidroxi-naftace-no-5,12-quinona	0,2	400		Agua sintética, de grifo, manantial y de río [Shamsipur, 2001]
Disco C ₁₈	(2,2'-[1,2-etanodilo bis(nitriloetilidino)] bis(1-naftaleno)	0,004	500		Agua de grifo, nieve, lluvia y agua de mar [Shamsipur, 2000]
Disco SDB	Piridoxal saliciloilhidrazona	0,004	100	1-60 µg/L	Agua sintética y agua de mar [Este trabajo]

Como puede verse, el compuesto PSH presenta para la determinación de Cu(II) por SPE un límite de detección de 0,004 µg/L que es inferior a la de los otros métodos propuestos en la bibliografía cuando se aplican a muestras de agua de mar. Además presenta muy buena selectividad, exactitud y reproducibilidad. El método está libre de

interferencias de matriz salinas y de otros metales traza a los niveles usuales presentes en agua de mar, con lo que puede utilizarse para medir trazas de cobre en agua de mar.

2.6. Conclusiones

Se ha desarrollado en este capítulo un método simple y rápido de Extracción en Fase Sólida para la preconcentración y el análisis de trazas de cobre en muestras de agua de mar, utilizando para ello discos de SDB de 47 mm y el reactivo *piridoxal saliciloilhidrazona* (PSH).

Como perspectiva de futuro, se comenzará a desarrollar un nuevo sensor químico de fibra óptica basado en la Extracción en Fase Sólida Colorimétrica, para el análisis de Cu(II) en muestras de agua real, utilizando de nuevo el reactivo orgánico PSH. De esta forma la detección será más rápida, disminuirá la manipulación de la muestra y se evitará el uso del eluyente para realizar posteriormente el análisis, por lo que esta modificación ofrecerá grandes ventajas en la detección, complementando las ventajas de la preconcentración.

Capítulo 3

*Estudio de especiación de plomo en agua de mar
mediante AGNES y SSCP*

3

Estudio de especiación de plomo en agua de mar mediante AGNES y SSCP

En el presente capítulo se estudia la aplicabilidad de las técnicas de Redisolución en Ausencia de Gradiente y en Equilibrio Nernstiano (AGNES), así como la Cronopotenciometría de Redisolución de Barrido (SSCP) para evaluar la especiación de Pb(II) en muestras de agua de mar, determinando la concentración de metal libre en el seno de la disolución y su constante de estabilidad en el sistema. La primera técnica servirá para medir la concentración de metal libre (más disponible) y la segunda servirá para el estudio de la especiación dinámica, permitiendo además la evaluación del carácter heterogéneo de los ligandos presentes en las muestras. Las concentraciones libres de metal en diversas muestras se compararán con los valores teóricos que pueden obtenerse mediante simulación de especiación química utilizando el software MINTEQ.

3.1. El plomo en la naturaleza

El plomo se encuentra de forma natural en la corteza terrestre a concentraciones aproximadas de 15-20 mg/kg [Abadin y Pohl, 2010]. Es el metal tóxico más extendido y es destacable su presencia en casi todos los compartimentos ambientales. Aunque hay más de 200 minerales de plomo, los más importantes son la galena (PbS), la cerusita (PbCO₃), la crocoíta (PbCrO₄) y la piromorfita (Pb₅(PO₄)₃Cl). Las principales causas naturales de

movilización de plomo desde la corteza terrestre a los ecosistemas acuáticos la constituyen las erupciones volcánicas y la meteorización de las rocas. Una vez allí, los compuestos insolubles de plomo se adsorben en los sedimentos o bien se adhieren en las partículas en suspensión (especialmente partículas de arcilla), funcionando éstas como secuestrante de compuestos de plomo.

En las aguas naturales, el plomo suele estar a nivel de trazas. La concentración de plomo en aguas superficiales de mar abierto se encuentra en el rango 0,000041 – 9 µg/L, mientras que en aguas superficiales costeras, bahías y estuarios puede oscilar entre 0,038 – 7,44 µg/L [Crompton, 2007]. Para este metal, por ejemplo, se conocen las vías de ingreso y las cantidades globales que acceden al Mar del Norte [Crompton, 2007]:

- Ríos: 2554 toneladas al año.
- Atmósfera: 2920 toneladas al año.
- Vertidos directos: 150 toneladas al año.
- Dragados: 3440 toneladas al año.

Asimismo, también se han publicado los valores de transferencia de plomo desde la atmósfera a las aguas superficiales marinas correspondientes al Mar del Norte, Mar Mediterráneo, Atlántico Sur y Pacífico Norte, siendo respectivamente: 2650, 1050, 660 y 7 ng/cm²/año [Díaz Mayans y col., 1993]. Las posibles diferencias entre las distintas zonas pueden deberse a la actividad industrial y urbana.

Por sus propiedades físicas y químicas se aplica en las industrias de la fabricación, de la construcción y química. Se ha empleado con diferentes fines, entre otros se pueden destacar: baterías, aditivos de la gasolina, aleaciones, munición, producción de plásticos, cerámicas, pigmentos y pinturas. La exposición al Pb se suele producir a través del agua potable, del alimento, del aire, del suelo y del polvo procedente de viejas pinturas que contienen plomo [Kasuba y col., 2010].

El envenenamiento subletal por Pb en vertebrados se caracteriza por la aparición de defectos neurológicos, disfunción del riñón y anemia, bloqueando la transmisión del impulso nervioso y la liberación de la acetilcolina. La anemia se produce como resultado de dos efectos básicos: la disminución de la longevidad de los glóbulos rojos y la inhibición de numerosas enzimas que intervienen en la síntesis de hemoglobina. También provoca la inhibición del metabolismo de los nucleótidos de pirimidina, que causa una acumulación de Pb en los glóbulos rojos. Además, induce inhibición en la síntesis de proteínas. Se han descrito efectos sobre diversas enzimas, como la disminución de la actividad de la ATPasa a nivel de la membrana de los hematíes, riñón e hígado y se ha reseñado un marcado aumento de enzimas en el suero acompañando a lesiones hepáticas. Cabe destacar la gran afinidad del plomo por las mitocondrias, donde inhibe la fosforilación oxidativa. Además de

los efectos que produce en los sistemas cardiovascular, renal y reproductivo, también se ha descubierto su efecto genotóxico [Ferrer, 2003; García-Lestón, 2012].

Se han señalado distintos efectos del plomo en los organismos de ecosistemas de agua dulce. Los peces presentan ennegrecimiento de las aletas y curvatura espinal; ambos procesos normalmente son reversibles, excepto en casos muy agudos. También se ha podido demostrar que los efectos tóxicos que produce en estos organismos son menos frecuentes cuando aumenta la dureza del agua. El grupo más sensible de los invertebrados de agua dulce son los crustáceos, aunque en este tipo de organismos no se ha podido demostrar la dependencia de su toxicidad con la dureza del agua. En ecosistemas marinos los datos son confusos debido a la relativa insolubilidad de los compuestos de plomo; esto ha dado lugar a la descripción de efectos adversos muy variados y en algunos casos opuestos, pero se conoce que las especies marinas son más resistentes que las que viven en medios dulceacuícolas [Crompton, 2007].

En humanos, el riesgo principal ante una exposición al Pb se centra en su efecto sobre el sistema nervioso. El plomo es un potente agente neurotóxico. El feto y el niño, en comparación con los adultos, son más vulnerables a esta exposición, ya que la barrera hematoencefálica que protege al cerebro adulto de la exposición a sustancias tóxicas no está totalmente formada hasta 6 meses después del nacimiento [Llop y col., 2012]. Los efectos sobre el sistema nervioso central se manifiestan como encefalopatías por exposición crónica o subcrónica, siendo los síntomas principales torpeza, irritabilidad, dolor de cabeza, temblor muscular, trastornos del movimiento y pérdida de memoria. Igualmente pueden darse trastornos sensoriales como el aumento de la sensación de dolor, calor, frío, etc. En casos extremos puede llegarse al coma y sobrevenir la muerte. Además, se han asociado diversos trastornos renales con la intoxicación por plomo; las células del túbulo proximal del riñón son las más afectadas y se produce una alteración de la reabsorción de glucosa, aminoácidos y fosfato [Ferrer, 2003].

La U.E. estableció en 2001 (*Reglamento (CE) Nº 466/2001, sobre el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios*) que la absorción de plomo puede constituir un grave riesgo para la salud pública, pudiendo provocar un retraso del desarrollo mental e intelectual de los niños y causar hipertensión y enfermedades cardiovasculares en los adultos. El plomo puede incorporarse al organismo por inhalación de polvos o por consumo de alimentos que contienen plomo o, en el caso de los vegetales, a través de sales de plomo solubles contenidas en el suelo. Si bien la inhalación es la vía de entrada más importante para las personas expuestas en razón de su profesión, la mayoría de la población lo incorpora al organismo a través de la ingesta y absorción en el tracto gastrointestinal. En la actualidad, la ingestión de plomo con la comida y el agua es la principal vía de exposición en la población general adulta [World Health Organization, 2007]. Como consecuencia del conocimiento de estos riesgos, los contenidos de Pb de los

productos alimenticios se han reducido sensiblemente en los últimos años, ya que ha aumentado la sensibilización ante el problema sanitario que puede representar este elemento. De hecho, las concentraciones de plomo detectadas en recientes estudios españoles son bajas en todos los grupos de alimentos analizados, por lo que el contenido medio de plomo en los productos alimenticios no parece ser causa de alarma [Martorell y col., 2011].

La ingesta de plomo a través del consumo de agua potable puede llegar a ser importante [Deshommes y col., 2010]. Este metal ha sido un constituyente muy utilizado en la soldadura y algunas formulaciones utilizadas para la unión de cañerías, por lo que el agua doméstica de hecho tiene algún contacto con el plomo (junto con cinc, cadmio y cobre). Actualmente, el plomo probablemente no sea ya un problema importante en el suministro de agua potable, puesto que ya se han sustituido la mayoría de las cañerías de plomo por PVC. Aún así, existe peligro potencial en los casos donde todavía estén en uso cañerías antiguas de plomo.

Una medida interesante adoptada por el Gobierno Español, en relación con la contaminación por este metal y consciente de la importancia de preservar el medio ambiente, fue el adelanto de la fecha de prohibición de comercialización de gasolinas con plomo en todo el territorio nacional, fijada mediante el Real Decreto 403/2000, de 24 de marzo, para el día 1 de Enero de 2002, al día 1 de Agosto de 2001, por el Real Decreto 785/2001, de 6 de Julio de 2001. Las gasolinas de sustitución pasaron a estar formadas por una mezcla de hidrocarburos de origen mineral y de compuestos oxigenados orgánicos, con las características adecuadas para ser utilizadas en los vehículos que anteriormente venían necesitando gasolina con plomo. Desde entonces, se ha demostrado que la concentración de plomo, tanto en el aire como en sangre de la población infantil española, ha ido disminuyendo notablemente gracias a las medidas legislativas que han regulado la cantidad máxima de plomo en la gasolina, desde 1987 hasta su prohibición total en agosto de 2001. Puede decirse, por tanto, que desde el punto de vista de la salud pública, la prohibición del uso de gasolina con plomo fue una acción que aumentó la protección de la salud de la población española [Llop y col., 2012].

Otras medidas similares también fueron adoptadas en otras naciones, como en Estados Unidos, donde la legislación estableció un límite máximo de plomo en gasolinas y se inició un programa de eliminación de compuestos de este metal en las gasolinas comercializadas. Como consecuencia, las concentraciones atmosféricas de plomo disminuyeron en un 89% entre los años 1980 y 2010 [U.S. EPA, 2010; Cho y col., 2011].

3.2. Técnicas electroanalíticas aplicadas al análisis y especiación de metales pesados

La especiación de metales determina en gran medida el comportamiento y la toxicidad de los metales en el medio ambiente. La especiación hace referencia a la presencia de un metal en varias formas químicas. Estas formas pueden incluir iones metálicos libres, complejos metálicos disueltos y adsorbidos sobre superficies sólidas, y especies metálicas coprecipitadas. La especiación de un metal no solo afecta a su toxicidad, sino también a su volatilización, fotólisis, absorción, deposición atmosférica, equilibrios ácido-base, polimerización, formación de complejos, reacciones de transferencia de electrones, solubilidad y equilibrios de precipitación, las transformaciones microbianas, y la difusión [Fairbrother y col., 2007].

Los parámetros que se utilizan para predecir la reactividad y el comportamiento de los metales pesados en la naturaleza son: la concentración total, la distribución de sus especies químicas, las propiedades de dichas especies y las de aquellos componentes presentes en la naturaleza que son capaces de reaccionar con el metal. La distribución, movilidad, toxicidad, bioacumulación y biodegradabilidad de los elementos depende no solo de su concentración, sino también de la forma química en la que éstos se encuentran [Ferreira Domingos, 2006].

Es por ello que la especiación es un factor importante que debe ser considerado a la hora de evaluar el comportamiento y la biodisponibilidad de los metales pesados en sistemas ambientales. Como se ha indicado en el capítulo de Introducción, la *especie química* ha sido definida por la IUPAC como la forma específica de un elemento considerada como su composición isotópica, su estado electrónico o de oxidación y/o su estructura compleja o molecular [Templeton y col., 2000]. La clave para comprender el efecto de estos elementos en la biota radica en esta especiación metálica. En este sentido, desde un punto de vista medioambiental, la investigación en especiación metálica está actualmente enfocada hacia dos objetivos: por un lado, establecer las especies metálicas potencialmente peligrosas y por otro, dilucidar los mecanismos de biotransformación de los metales como función de sus diferentes formas químicas.

La especiación, dentro de un contexto químico, indica la distribución de un elemento en sus diferentes especies químicas. Esta distinción es muy importante ya que puede afectar en gran medida a la reactividad química y biológica.

Los sistemas acuáticos naturales están sujetos a condiciones variables, por lo que en la mayoría de los casos, no se encuentran en equilibrio químico. En estos sistemas, el carácter tóxico de un metal no sólo depende de su equilibrio de distribución entre los numerosos complejos metálicos que se pueden formar, sino también de la labilidad de esas especies,

es decir, de las constantes de velocidad de complejación y los coeficientes de difusión del metal, del ligando y de los complejos en las diferentes fases de los ecosistemas acuáticos [Buffle y col., 2007].

El conocimiento de estos factores dinámicos es fundamental para establecer de manera rigurosa y cuantitativa la relación que existe entre la especiación de un ión metálico y su biodisponibilidad e ingestión en los organismos acuáticos. Para realizar una interpretación correcta del impacto medioambiental que pueden producir los complejos metálicos en los sistemas acuáticos, debe considerarse la importancia de la reactividad y los flujos de cada una de las especies presentes, así como su intercambio entre los compartimentos y la biota a través de procesos de interfase, y las escalas temporales de dichos procesos. Es por ello que el análisis mediante técnicas de especiación dinámica es necesario para entender las propiedades de no-equilibrio de estos sistemas. Así, el análisis por *especiación dinámica* no solo se basa en el estudio de la distribución de las especies en equilibrio, sino también de las características cinéticas de interconversión entre dichas especies. De esta forma, tanto las propiedades cinéticas como termodinámicas de cada una de las especies influyen en la señal analítica de las técnicas dinámicas [van Leeuwen y col., 2005].

Las técnicas de especiación dinámica intentan reproducir los procesos que ocurren en un sistema acuático. En el caso de las técnicas electroquímicas, muy utilizadas en este tipo de análisis, se hace uso de un electrodo de trabajo, el cual presenta una interfase entre su superficie y la disolución, simulando el comportamiento de la membrana celular de los organismos, a través de la cual se produce el transporte de metal desde el agua hacia el interior de los mismos. En la Figura 3.1 se muestra una representación esquemática del papel que juega la especiación dinámica en un medio con un organismo que ingiere metal. Pueden observarse claramente las similitudes que presenta con lo que ocurre en la interfase del electrodo de trabajo.

Dentro del contexto de la especiación dinámica, el flujo total que se crea en la interfase, puede dividirse en un flujo de difusión (que depende del transporte de masa) y un flujo cinético (que depende de la velocidad de asociación/disociación de las especies). Así, se pueden describir dos condiciones extremas [Mota y col., 2012]:

- (a) Sistemas estáticos, en los que los complejos no tienen tiempo de disociarse o asociarse en la capa de difusión que se crea entre el electrodo y el seno de la disolución, debido a que la cinética de estos sistemas es muy lenta. En este caso, estas especies no contribuyen a la señal analítica, por lo que se consideran complejos inertes. En presencia de este tipo de complejos, la señal analítica estará relacionada directamente con el metal libre de la disolución.

- (b) Sistemas dinámicos, en los que la velocidad de disociación o asociación del complejo es suficientemente alta como para que el proceso se produzca dentro de la escala de tiempo de medida de la técnica. En este caso, son posibles dos situaciones:
- Complejos lábiles: el flujo cinético es mucho mayor que el de difusión, por lo que el metal libre estará en equilibrio con su forma complejada a lo largo de toda la capa de difusión hasta la superficie del electrodo, y la concentración total de metal contribuirá a la señal. Este sistema estaría controlado por el flujo de difusión.
 - Complejos no lábiles: los flujos cinéticos y de difusión son del mismo orden de magnitud. La señal medida vendrá influenciada por las características cinéticas (control cinético).

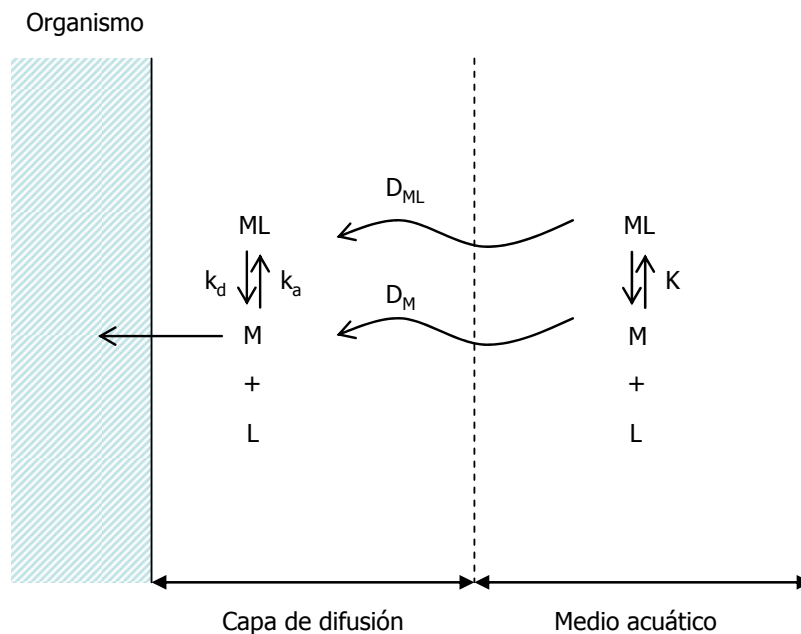


Figura 3.1. Representación esquemática de la especiación dinámica en un medio con un organismo que ingiere metal (M: metal libre, ML: complejo metálico, D: coeficiente de difusión, k_a : constante de velocidad de asociación, k_d : constante de velocidad de disociación, K: constante de estabilidad del complejo)

Por todo lo anteriormente mencionado, es necesario realizar un análisis detallado de la especiación dinámica para un mejor conocimiento de los sistemas naturales estudiados.

La dificultad de la realización de la especiación sobre muestras acuáticas medioambientales radica en las laboriosas y complicadas etapas que todo muestreo necesita: un adecuado sistema de recogida de muestras, estabilización de las diferentes formas químicas del metal durante el muestreo, traslado al laboratorio, conservación (si es posible) y protocolo de análisis. A pesar de esto, se han empleado con éxito diversas técnicas analíticas espectroscópicas para la determinación de la especiación, relacionada principalmente con distintas formas químicas de Hg, As, Mn y Cr [Jia y col., 2011; Boyaci y col., 2011; Citak y col., 2010; Duran y col., 2011]. Sin embargo, este tipo de técnicas espectroscópicas tienen el inconveniente de que solo pueden utilizarse para el análisis de especiación si están acopladas a técnicas de separación [Pesavento y col., 2009]. Por el contrario, las técnicas electroquímicas, poco empleadas hasta el momento, tienen un gran potencial para el estudio directo de la especiación en muestras medioambientales. Estas técnicas se basan en la medida de señales eléctricas asociadas con las propiedades moleculares o los procesos en las interfases de las especies químicas. La transformación directa de la información química deseada (concentración o actividad) en una señal eléctrica hace que estos métodos sean sencillos y baratos. Dentro de las técnicas electroquímicas, las de redisolución juegan un papel muy importante en los estudios la especiación dinámica. Estas últimas consisten en una acumulación del analito sobre la superficie de un electrodo de trabajo y en una subsiguiente redisolución del mismo mediante una técnica voltamperométrica, potenciométrica o coulombimétrica [Lovric, 2010].

3.2.1. Voltamperometría de redisolución

Entre las técnicas electroquímicas más empleadas en los análisis de especiación de metales traza se encuentra la *Voltamperometría de redisolución*. Las técnicas voltamperométricas de redisolución están basadas en la preconcentración del analito presente en una disolución en la superficie de un electrodo y su posterior redisolución. Si las condiciones experimentales se mantienen constantes durante la etapa de preconcentración, a partir de los calibrados adecuados, la respuesta voltamperométrica (por ejemplo, intensidad de corriente (I) que circula entre un electrodo de trabajo y un electrodo auxiliar, debido a la reducción o la oxidación de una especie en función del potencial aplicado (E) en el electrodo de trabajo) puede emplearse para determinar la concentración en disolución de la especie preconcentrada. La mayor ventaja de esta técnica radica precisamente en dicha preconcentración sobre el electrodo, con factores que oscilan entre 100 y más de 1000, lo que hace que la voltamperometría de redisolución sea especialmente adecuada para el análisis de trazas, consiguiéndose límites de detección de hasta 10^{-10} - 10^{-11} mol/L [Pingarrón Carrazón y Sánchez Batanero, 2003; Lovric, 2010].

La voltamperometría de redisolución se caracteriza por la combinación de tres etapas durante el proceso de análisis:

- Etapas de preconcentración o deposición: el analito disuelto en la muestra se acumula en la superficie o en el interior del electrodo de trabajo mediante un proceso de oxidación, reducción o adsorción. Durante esta etapa, la disolución se agita para garantizar la difusión del analito hasta las proximidades del electrodo, y se aplica un determinado potencial conocido como potencial de preconcentración o deposición, cuyo valor depende del potencial redox del analito y del procedimiento de deposición del mismo. En este paso de electrodeposición, la cantidad de metal preconcentrado depende de su concentración en disolución y de las condiciones electroquímicas e hidrodinámicas del sistema, que han de mantenerse constantes con el fin de asegurar la reproducibilidad de las medidas. En este paso, la deposición se ve facilitada por un transporte convectivo de los iones hacia la superficie del electrodo como resultado de la agitación, un transporte por migración bajo la influencia de un campo eléctrico y un transporte por difusión, debido a diferencias de concentración en la interfase entre la superficie del electrodo y el seno de la disolución

- Etapas de reposo: durante la etapa de deposición, la concentración de analito en el electrodo presenta una distribución parabólica, aumentando en dirección hacia el electrodo. La etapa de redisolución requiere una distribución inicial uniforme de la concentración en el electrodo. Por ello, tras la etapa de electrodeposición normalmente se detiene la agitación, con lo que el transporte solo se ve influenciado por la difusión, permitiendo alcanzar rápidamente una distribución uniforme. Esta etapa de reposo dura generalmente unos 10 o 15 s.

- Etapas de redisolución: en esta etapa, se aplica un barrido de potencial entre los electrodos de tal manera que el analito es sometido a un proceso de oxidación o reducción que le devuelve hasta una forma química que favorezca su redisolución hacia el seno de la disolución. En ese momento se registra la intensidad de corriente, que será proporcional a la concentración del analito en la disolución de la muestra, frente al potencial aplicado, dando lugar a un *voltamperograma*. Sin embargo, en ciertos casos esta etapa no implica necesariamente la redisolución del analito hacia el seno de la disolución como consecuencia del proceso de oxidación/reducción, pudiendo quedar éste retenido en la superficie o bien incorporado en el interior del electrodo si se trabaja con electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE) mediante la formación de una amalgama, aunque se incluyen dentro de este grupo de técnicas y se mantiene el nombre de redisolución.

Para la cuantificación de la concentración de analito suele emplearse el método de las adiciones patrón en lugar de la típica curva de calibración directa, ya que la sensibilidad de los métodos de redisolución puede variar en función de la composición de la matriz de la disolución, lo que resulta especialmente importante en matrices de diferente salinidad (ej.

agua de estuario, agua de río, agua de mar,...). Así, realizando adiciones sobre la muestra, se garantiza la realización de todas las medidas en similares condiciones.

Las técnicas de voltamperometría más ampliamente utilizadas en el análisis de especiación dinámica de trazas metálicas son la *Voltamperometría de Redisolución Anódica* (ASV) y la *Voltamperometría de Redisolución Catódica Adsorptiva por Competición de Ligando* (CL-AdCSV) [Mota y col., 2010]. A continuación se detallará cada una de estas dos técnicas, teniendo en cuenta que para el entendimiento correcto de la CL-AdCSV es necesario explicar previamente las características básicas de otras dos técnicas, como son la *Voltamperometría de Redisolución Catódica* (CSV) y la *Voltamperometría de Redisolución Catódica Adsorptiva* (AdCSV).

-*Voltamperometría de Redisolución Anódica*: en esta técnica se determinan iones metálicos mediante una electrodeposición catódica previa (aplicando un potencial más negativo que el potencial de reducción de los iones metálicos), de tal forma que se produce una reducción del analito (M^{n+}) hacia su forma metálica (M) y su deposición en el electrodo. Posteriormente, se aplica una redisolución anódica mediante un barrido de potencial hacia valores más positivos, de manera que se consigue una oxidación del metal cuando el potencial alcance el valor de potencial del par redox correspondiente. La máxima sensibilidad de esta técnica se consigue con electrodos de película, aunque suelen ser poco reproducibles [Vyskocil y Barek, 2009; Mota y col., 2012].

La técnica de ASV se ha utilizado durante más de 30 años en la determinación de metales traza en aguas. Esta técnica puede medir la concentración de metal total en la muestra previa acidificación y digestión por UV de la misma [Buffle y Tercier-Waeber, 2005].

En el caso de que no se lleve a cabo un pretratamiento de la muestra, la técnica ASV mide las concentraciones de equilibrio de los iones metálicos libres, así como aquéllos que resultan de la disociación de complejos lábiles en la capa de difusión durante el tiempo que dura el análisis [Pesavento y col., 2009].

Además, esta técnica no perturba la distribución de las especies por lo que puede identificar y cuantificar cada una de las especies en función de su potencial de reducción. La alta sensibilidad de esta técnica permite la detección de numerosos elementos traza frecuentes en la naturaleza y con interés medioambiental, como por ejemplo Cu, Pb, Cd o Zn (en agua de mar muchas especies de interés aparecen a concentraciones de 10^{-9} mol/L, que pueden ser analizadas por ASV).

Sin embargo, ASV presenta ciertos inconvenientes a la hora de estudiar los parámetros de complejación de ciertos sistemas: las medidas y la interpretación de los datos son sensibles a la cinética de disociación de los iones metálicos complejados, a las condiciones hidrodinámicas (que dependen de la velocidad de agitación), a la heterogeneidad de los

complejos presentes en la muestra, a los coeficientes de difusión de los complejos si existen macromoléculas (como, por ejemplo, materia orgánica coloidal), a la concentración de ligando y efectos de superficie (como la ausencia de exceso de ligando en la superficie del electrodo durante la etapa de redisolución) y a la adsorción de materia orgánica sobre el electrodo [Mota y col., 2012].

Aún así, la ASV ha sido ampliamente utilizada en el análisis de especiación de metales traza en muestras medioambientales. En la Tabla 3.1 se recogen algunas aplicaciones típicas más recientes de la voltamperometría de redisolución anódica utilizando diversos tipos de electrodos.

Tabla 3.1. Aplicaciones recientes del análisis por voltamperometría de redisolución anódica a la especiación metálica en aguas

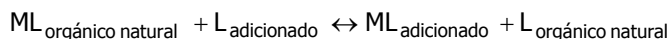
Metales	Tipo de muestra	Electrodo de trabajo	Referencias
Zn(II)	Agua de mar	Electrodo rotatorio de carbono vitrificado	Jakuba y col., 2008
Cu(II)	Agua de estuario	Electrodo de gota estática de mercurio	Louis y col., 2009
Cu(II)	Agua de estuario	Electrodo de gota estática de mercurio	Omanovic y col., 2010
Pb(II) Zn(II)	Agua de río	Electrodo de gota colgante de mercurio	Magnier y col., 2011
Cu(II) Pb(II) Zn(II)	Agua de estuario	Electrodo de gota colgante de mercurio	Durán y Nieto, 2011
Cd(II) Zn(II)	Agua de estuario	Microelectrodo de película de bismuto	de Souza y col., 2011
Cd(II) Cu(II) Pb(II)	Agua de mar	Electrodo rotatorio de película fina de mercurio	Annibaldi y col., 2011
As(III) As(V)	Agua de estuario	Electrodo rotatorio de oro	Balzer y col., 2012
Cu(II) Zn(II)	Agua de embalse	Electrodo de gota colgante de mercurio	Tonietto y Grassi, 2012
Cd(II) Cu(II) Pb(II) Zn(II)	Agua de drenaje ácido de mina	Electrodo de carbono vitrificado con película fina de mercurio	Jung y col., 2012

- *Voltamperometría de Redisolución Catódica (CSV)*: esta modalidad es utilizada para la determinación de especies inorgánicas y orgánicas susceptibles de formar compuestos poco solubles con los iones procedentes de la oxidación del electrodo. Así, aplicando un potencial

ligeramente positivo al electrodo de trabajo (suficiente para que se produzca dicha oxidación del material electródico) en presencia de una de estas especies, se forma una fina película de sal poco soluble en la superficie de dicho electrodo. Tras la etapa de preconcentración, la película depositada es redisuelta mediante un barrido catódico de potencial, midiendo la señal electroquímica. En este caso, la mayor sensibilidad se alcanza usando electrodos de gran superficie, como el de gota colgante de mercurio (HMDE), donde se puede depositar una gran cantidad del compuesto poco soluble. La aplicabilidad de la CSV es mucho más limitada y se usa para compuestos que formen sales o complejos de mercurio insolubles [Pingarrón Carrazón y Sánchez Batanero, 2003].

- *Voltamperometría de Redisolución Catódica Adsorbtiva (AdCSV)*: esta técnica se basa en una etapa de preconcentración adsorbtiva no electrolítica. Así, el analito se deposita en el electrodo de trabajo mediante un mecanismo de adsorción. Posteriormente, el analito preconcentrado puede cuantificarse empleando un programa de potencial apropiado que permita la reducción del mismo. En este tipo de técnicas se suele utilizar un ligando orgánico que forme complejo con el metal que se va a analizar. En la primera etapa, y mediante agitación, se forma el complejo metálico, el cual se preconcentrará en el electrodo. En la etapa de redisolución, lo más frecuente es que el complejo se rompa al reducirse el metal, permitiendo que el ligando pase de nuevo a la disolución. El metal reducido queda retenido bien en la superficie del electrodo o en sus proximidades, según el metal en cuestión. En otros casos, puede ocurrir que la especie que se reduce es el ligando, y el metal quede en su estado oxidado. Este método se considera complementario a la ASV puesto que es adecuado para analizar metales que no son acumulables en superficies electródicas por medio de una electrolisis. AdCSV es una técnica muy sensible y frecuentemente utilizada, sin embargo su uso en análisis medioambiental es un poco limitado ya que es menos robusta y más propensa a sufrir interferencias producidas por compuestos presentes en las matrices medioambientales. Por ello, debería ser utilizada para el análisis de muestras relativamente *limpias* (como agua potable) o bien, muestras que previamente hayan sido sometidas a un proceso de *limpieza* o separación [Vyskocil y Barek, 2009].

- *Voltamperometría de Redisolución Catódica Adsorbtiva por competición entre ligandos (CL-AdCSV)*: los estudios de especiación mediante AdCSV suelen aplicarse de forma más eficiente si se combinan con el método de competición entre ligandos (CL), en el cual se añade a la muestra un ligando L, no presente originalmente en la misma, que forme un complejo muy estable con el metal a estudiar y que sea cuantificable mediante AdCSV, el cual competirá con los ligandos naturales por la formación de complejos metálicos [Millar y Bruland, 1997; Monticelli y col., 2010]. La medida se hace cuando se ha establecido el equilibrio competitivo entre el ligando L adicionado y el complejo orgánico natural ML:



Finalmente, el complejo formado ($ML_{\text{adicionado}}$) se mide por voltamperometría de redisolución adsorbtiva.

Las condiciones de competición [Van den Berg y Donat, 1992] deben ser cuidadosamente controladas mediante la elección de un ligando apropiado (cuya constante de estabilidad condicional sea conocida para el metal a investigar) y la adición de la concentración adecuada.

La competición de ligandos no solo sirve para precisar las fracciones lábiles de metales pesados a nivel de trazas, sino también para establecer la concentración de ligandos complejantes naturales (L), así como sus constantes de estabilidad condicionales (K'_{ML}). Todo ello, resuelve el problema de la necesidad de determinar las diferentes especies químicas en las que se encuentran los metales traza en una muestra real, imprescindible para conocer su toxicidad, biodisponibilidad, comportamiento biogeoquímico, así como el riesgo potencial de su presencia en el medio ambiente.

Destacan los estudios por competición de ligandos mediante voltamperometría de redisolución catódica adsorbtiva realizados por Nimmo y col., (1997 y 1998). Estos autores han estudiado las especies más disponibles de Cu, Pb, Cd, Ni y Co en aguas marinas por CL-AdCSV. También ha sido ampliamente aplicada en los laboratorios oceanográficos [Van den Berg y Nimmo, 1987] y se ha convertido en un método ampliamente utilizado para investigar la complejación de varios metales por la materia orgánica natural [Van Leeuwen y Town, 2005]. También, se han empleado estos métodos para el estudio de la especiación de Fe en agua de mar [Van Den Berg, 1995; Macrellis y Col., 2001; Rue y Bruland, 2001], mostrando que el 99% de este metal se encuentra fuertemente complejoado con ligandos naturales.

Una limitación importante a considerar en la determinación de la especiación de metales pesados es que es realmente necesario que la disolución llegue al equilibrio durante la primera etapa del método. Normalmente, se considera que se ha alcanzado el equilibrio cuando, después de la adición del ligando, la medida de la corriente permanece constante con el tiempo. Sin embargo, durante la aplicación de la técnica puede producirse una liberación lenta del metal libre por disociación de complejos naturales con altas constantes de equilibrio y bajas velocidades de disociación, creando una disminución de la señal con el tiempo y alcanzando un equilibrio aparente que llevará a errores experimentales [Mota y col., 2012].

Entre los ligandos más utilizados para los estudios de especiación mediante competición de ligandos se pueden citar los siguientes: tropolona, 8-hidroxiquinoleína, salicilaldoxima, catecol, benzoilacetona, pirrolidin ditiocarbamato de amonio, dimetilglioxima, 1-nitroso-2-naftol, etc. En la Tabla 3.2 se incluye una revisión de estos

ligandos complejantes utilizados en análisis de especiación de metales en muestras de aguas de diferente naturaleza aplicando el método de competición de ligandos.

3.2.2. Cronopotenciometría de redisolución de barrido (SSCP)

Asimismo, recientemente se ha desarrollado una nueva técnica para el estudio de la especiación dinámica de metales, denominada Cronopotenciometría de redisolución de barrido (SSCP) (van Leeuwen y Town, 2003; Town y van Leeuwen, 2004a; Pinheiro y van Leeuwen, 2004) a partir de la técnica tradicional de cronopotenciometría de redisolución (SCP). Esta técnica SCP es adecuada para estudios de complejación de metales traza debido a su sensibilidad y su capacidad para proporcionar información sobre la naturaleza dinámica de los complejos, aunque solo puede ser aplicada a los metales que forman amalgama con el electrodo. La SCP consiste en dos etapas: la etapa de deposición, en la que los iones metálicos se reducen y depositan en el electrodo a potencial constante, de manera similar a lo que ocurre en la voltamperometría de redisolución anódica; y la etapa de redisolución, en la que el metal acumulado se reoxida mediante la aplicación de una corriente oxidante constante. Cuando la corriente de redisolución es suficientemente pequeña, el metal, que previamente se ha acumulado en la gota, se redisuelve lentamente produciendo una señal elevada cuando se redisuelve completamente. En estas circunstancias, puede aplicarse fácilmente la ley de Faraday para obtener una relación directa cuantitativa entre la señal analítica (tiempo de transición o redisolución τ) y la concentración de las especies en la muestra. Sin embargo, en presencia de ligandos, no existe una relación directa entre los parámetros que caracterizan el pico (potencial y anchura media) y la especiación en la muestra. Este inconveniente se resuelve haciendo uso de la cronopotenciometría de redisolución de barrido (en la que se realizan varias medidas de SCP a diferentes valores de potencial de deposición) que soluciona cualquier problema relacionado con la interpretación de los resultados. Los parámetros característicos de la curva SSCP (la altura máxima de la curva, es decir, el valor límite del tiempo de transición τ^* , y el potencial de semi-onda $\Delta E_{1/2}$) son sensibles a la pérdida de labilidad, por lo que proporcionan información relacionada con la especiación [Mota y col., 2012].

Tabla 3.2. Determinación de la complejación metálica en aguas naturales por el método de competición de ligandos y voltamperometría de redisolución catódica adsorbtiva (CL-AdCSV)

Metales	Tipo de muestra	Ligando adicionado	AdCSV ^a	Referencias
Zn(II)	Agua de mar	Pirrolidín ditiocarbamato de amonio	HMDE	Van den Berg, 1985
Cu(II) Zn(II)	Agua de estuario	Catecol; Pirrolidín ditiocarbamato de amonio	HMDE	Van den Berg y Nimmo, 1987
Cu(II)	Agua de mar	8-Hidroxiquinoleína	SMDE	Van den Berg y Donat, 1992
Cu(II)	Agua de mar	Tropolona	HMDE	Donat y Van den Berg, 1992
Cu(II)	Agua dulce	1-(2-Tiazolilazo)-2-naftol	SMDE	Farias y col., 1992
Cu(II)	Agua de mar	Salicilaldoxima	HMDE	Campos y Van den Berg, 1994
Cu(II)	Agua dulce	8-Hidroxiquinoleína	SMDE	Jin y Gogan, 2000
Zn(II)	Agua oceánica	Pirrolidín ditiocarbamato de amonio	SMDE	Ellwood y Van den Berg, 2000
Co(II)	Agua de mar	Nioxima	SMDE	Ellwood y Van den Berg, 2001
Pb(II)	Agua de lago	Azul de calceína	HMDE	Fischer y Van den Berg, 2001
Ni(II)	Agua dulce	Dimetilglioxima	HMDE	Guthrie y col., 2003
Cu(II)	Agua de lluvia	Tropolona	HMDE	Witt y Jickells, 2005
Cu(II)	Agua de mar	Salicilaldoxima	SMDE	Buck y Bruland, 2005
1) Co(II), Ni(II) 2) Cu(II) 3) Zn(II)	Agua dulce	1) Dimetilglioxima 2) 8-Hidroxiquinoleína 3) Pirrolidín ditiocarbamato de amonio	HMDE	Chakraborty y Chakrabarti, 2006
Fe(III)	Agua natural	Formaldehído	HMDE	Laglera y col., 2007
Cu(II)	Agua de lluvia	Salicilaldoxima	HMDE	Witt y col., 2007
Fe(III)	Agua de mar	2-(2-Tiazolilazo)-p-cresol	HMDE	Bennett y col., 2008
Fe(III)	Agua de mar	2-(2-Tiazolilazo)-p-cresol	HMDE	Wu y Jin, 2009
Cu(II)	Agua de estuario	Salicilaldoxima	HMDE	Money y col., 2011
Fe(III)	Agua de lluvia	1-Nitroso-2-naftol	SMDE	Cheize y col., 2012
Cu(II)	Agua de lluvia	Salicilaldoxima	HMDE	Nason y col., 2012

^a HMDE: electrodo de gota colgante de Hg; SMDE: electrodo de gota estática de Hg

3.2.3. Redisolución en ausencia de gradiente y en equilibrio Nernstiano (AGNES)

Por otro lado, la técnica de redisolución en ausencia de gradiente y en equilibrio Nernstiano, AGNES, ha sido desarrollada y aplicada para la determinación de concentraciones de metal libre por Galceran y col., 2004, y puede ser una alternativa a otras técnicas existentes, especialmente para aquellos iones metálicos, tales como Zn, para los que no hay disponibles electrodos selectivos de iones comerciales [Galceran y col., 2007]. Durante la etapa de deposición, el metal se amalgama en la gota de mercurio hasta alcanzar un equilibrio Nernstiano sin gradiente de concentración. Por lo tanto, la concentración de metal amalgamado y la corriente de redisolución faradaica medida son proporcionales a la concentración de metal libre en la disolución.

Ambas técnicas (SSCP y AGNES) aplicadas conjuntamente presentan un gran potencial para el estudio de la especiación de metales traza en muestras de aguas naturales. En la Tabla 3.3 se muestran las aplicaciones de estas técnicas en estudios de especiación de metales.

Tabla 3.3. Aplicación de las técnicas AGNES y SSCP al estudio de especiación de metales en diferentes muestras

Metales	Método	Muestra	Ligando estudiado ^a	Electrodo de trabajo ^b	Referencia
Cd(II)	AGNES	Disolución de metal	NTA	HMDE	Galceran y col., 2004
Zn(II)	AGNES	Disolución de metal (pH: 6)	1) NTA 2) AEDT 3) Oxalato	HMDE	Companys y col., 2005
Zn(II)	AGNES	Agua de mar costera	Sin ligando	HMDE	Galceran y col., 2007
Pb(II)	AGNES	Disolución de metal (pH: 6,1)	PDCA	HMDE y Hg-Ir	Huidobro y col., 2007
Pb(II)	AGNES	Disolución de metal (pH: 4)	1) Nanoesferas carboxiladas de Latex 2) IDA	TMF-RDE	Rocha y col., 2010
Zn(II) Cd(II)	AGNES	Disoluciones de metal (pH: 3-5)	Sin ligando	HMDE	Galceran y col., 2010
Zn(II)	AGNES	Disolución de metal (pH: 6), agua de río, real y sintética	PDCA (en disolución de metal)	HMDE	Zavarise y col., 2010
Zn(II) Cd(II) Pb(II)	AGNES	Disoluciones de metal (pH: 2-7)	Oxalato	SPE y HMDE	Parat y col., 2011a

Tabla 3.3 (cont.). Aplicación de las técnicas AGNES y SSCP al estudio de especiación de metales en diferentes muestras

Metales	Método	Muestra	Ligando estudiado ^a	Electrodo de trabajo ^b	Referencia
Zn(II) Cd(II) Pb(II)	AGNES- SCP	Disoluciones de metal (pH: 4,8 y 6)	1) Oxalato 2) NTA	SPE y HMDE	Parat y col., 2011b
Zn(II)	AGNES	Disolución de metal (pH: 5,5 y 6,2), agua de río y muestras de suelo	NTA (en disolución de metal)	HMDE	Chito y col., 2012
Cd(II) Pb(II)	SSCP	Disoluciones de metal (pH: 4,8 y 6,5)	1) PDCA 2) Ácido fúlvico	Hg-Ir	Van Leeuwen y Town, 2002a
Cd(II) Pb(II)	SSCP	Disoluciones de metal (pH: 5)	Sin ligando	HMDE y Hg-Ir	Van Leeuwen y Town, 2002b, 2002c
Cd(II) Cu(II) Pb(II)	SSCP	Disoluciones de metal (pH: 5-8)	1) Ácido fúlvico 2) Ácido húmico 3) Materia orgánica	HMDE y Hg-Ir	Van Leeuwen y Town, 2003a
Zn(II)	SSCP	Disolución de metal (pH: 5)	Sin ligando	HMDE y Hg-Ir	Van Leeuwen y Town, 2003b
Cd(II) Pb(II)	SSCP	Disoluciones de metal (pH: 5 y 6)	1) PDCA 2) Ácido húmico 3) Ácido fúlvico	HMDE	Town y van Leeuwen, 2003
Cd(II)	SSCP	Disolución de metal (pH: 4, 5 y 8)	NTA	HMDE y Hg-Ir	Van Leeuwen y Town, 2004
Cd(II) Pb(II)	SSCP	Disoluciones de Cd(II) y Pb(II) (pH: 5,15-7,23)	Nanoesferas carboxiladas de Latex	HMDE	Pinheiro y van Leeuwen, 2004; Pinheiro y col., 2005, 2006
Cd(II) Cu(II) Pb(II)	SSCP	Disoluciones de Cd(II) (pH: 6 y 8), Cu(II) y Pb(II) (pH: 5)	1) PDCA 2) Ácido húmico	HMDE y Hg-Ir	Town y van Leeuwen, 2004a
Cd(II) Zn(II)	SSCP	Disoluciones de metal (pH: 5)	Sistemas multimetálicos	HMDE y Hg-Ir	Town y van Leeuwen, 2004b
Ni(II) Zn(II)	SSCP	Disoluciones de metal (pH: 4,7 y 6)	1) NTA 2) Ácido cítrico 3) Ácido tartárico	HMDE	Town y col., 2005

Tabla 3.3 (cont.). Aplicación de las técnicas AGNES y SSCP al estudio de especiación de metales en diferentes muestras

Metales	Método	Muestra	Ligando estudiado ^a	Electrodo de trabajo ^b	Referencia
Cd(II) Pb(II)	SSCP	Disoluciones de Cd(II) (pH: 4,8 y 7) y de Pb(II) (pH: 4,8 y 8)	1) PCA 2) PDCA 3) Histidina 4) NTA	Hg-Ir en presencia y ausencia de una capa de gel de agarosa	Town y col., 2006
Cd(II) Zn(II)	SSCP	Disoluciones de Cd(II) (pH 6 y 8) y de Zn(II) (pH: 4,7)	1) IDA 2) HIMDA 3) PDCA	HMDE y Hg-Ir	Van Leeuwen y Town, 2006
Pb(II)	SSCP	Disolución de metal (pH: 6,3)	1) Ácido aspártico 2) Dextrans I, II, III	Hg-Ir en presencia y ausencia de una capa de gel de agarosa	Noel y col., 2006
Cd(II) Pb(II)	SSCP	Disoluciones de metal (pH: 4,5-8)	1) Nanoesferas carboxiladas de Latex 2) Nanopartículas de Au y Ag 3) Ácido fúlvico 4) Ácido húmico	SMDE	Pinheiro y col., 2007
Pb(II)	SSCP	Disolución de metal (pH: 5,5)	Nanoesferas carboxiladas de Latex	TMFE	Rocha y col., 2007
Cd(II)	SSCP	Disolución de metal (pH: 5,5)	1) Ftalato 2) Ioduro	HMDE	Serrano y col., 2007
Cd(II) Pb(II)	SSCP	Disoluciones de metal (pH: 5,2-6,4)	Nanoesferas carboxiladas de Latex	SMDE	Domingos y col., 2007
Cd(II) Pb(II)	SSCP y AGNES	Disoluciones de Cd(II) (pH: 6-7,6) y de Pb(II) (pH: 5-6,1)	1) PDCA 2) Nanoesferas carboxiladas de Latex 3) Ácido húmico	SMDE	Domingos y col., 2008
Cd(II)	SSCP	Disolución de metal (pH: 4,3 y 7,15)	1) NTA 2) PDCA	TMF-SPE	Parat y col., 2011c

^a AEDT: Ácido etilendiaminotetraacético; HIMDA: ácido *N*-(2-hidroxietil)iminodiacético; IDA: Ácido iminodiacético; NTA: Ácido nitrilotriacético; PCA: Ácido piridina-2-carboxílico; PDCA: Ácido 2,6-piridindicarboxílico

^b Hg-Ir: Microelectrodo de disco de iridio recubierto de mercurio; HMDE: electrodo de gota colgante de Hg; MDE: Electrodo de gota de mercurio; TMFE: electrodo de película fina de mercurio; TMF-RDE: electrodo de disco rotativo de película fina de mercurio; TMF-SPE: electrodo de película fina de mercurio serigrafiado; SMDE: electrodo de gota estática de Hg; SPE: Electrodo serigrafiado

Como puede concluirse de la tabla, hasta ahora no se han aplicado ambas técnicas en muestras de agua de mar para el estudio de especiación del Pb.

Se han descrito hasta el momento las técnicas más comúnmente empleadas en el estudio de especiación de metales traza. Sin embargo, las técnicas voltamperométricas de redisolución (SV) presentan algunos inconvenientes, a diferencia de las técnicas SCP y AGNES (tal y como se explicará en la siguiente sección).

Es por ello que uno de los objetivos de esta Tesis Doctoral ha sido la aplicación de dichas técnicas en el análisis de Pb(II) en muestras reales de agua de mar. Dado que este capítulo se centra en el estudio de especiación de dicho metal mediante la utilización de estas dos últimas técnicas, a continuación se detalla ampliamente el fundamento de cada una de ellas.

3.3. Fundamentos teóricos de las técnicas SCP y SSCP

La cronopotenciometría de redisolución de barrido (SSCP) está englobada dentro de las técnicas de especiación dinámica de metales que actualmente se aplican en análisis. Puesto que la SSCP deriva de la técnica de cronopotenciometría de redisolución (SCP), es necesario conocer primero las características de ésta con la finalidad de conseguir una mejor comprensión de la SSCP.

3.3.1. Fundamentos de la Cronopotenciometría de Redisolución (SCP)

El uso de las técnicas de redisolución para estudios de especiación ha ido incrementando desde que se desarrolló la cronopotenciometría de redisolución (SCP). En esta técnica, la reoxidación del metal acumulado se consigue mediante la aplicación de una corriente de oxidación constante I_s , y la señal analítica es el tiempo necesario para la reoxidación del metal, es decir, el tiempo de transición o redisolución, conocido como τ .

Un aspecto importante sobre la técnica SCP es que la interpretación de los datos requiere un conocimiento del tipo de régimen del tiempo de redisolución con el que se trabaja. Town y van Leeuwen demostraron en 2001 que cuando se utilizan altas corrientes de redisolución se observan líneas bases poco apropiadas, como consecuencia de un proceso faradaico que no permite una reoxidación completa del metal acumulado. En este caso, el régimen se define como régimen de difusión lineal semi-infinita (en el que $I\tau^{1/2}$ es constante y τ es proporcional al cuadrado de la concentración del metal). De modo inverso, cuando se aplican corrientes bajas, la reoxidación ocurre lentamente y el metal acumulado termina por agotarse completamente cuando el proceso de redisolución llega a su final, por

lo que la señal analítica es relativamente elevada y el régimen de tiempo se define como régimen de redisolución completa o difusión limitada ($I\tau$ es constante y τ es proporcional a la concentración del metal). La sensibilidad y resolución son mayores bajo condiciones de redisolución completa, y comparables con las de las técnicas de voltamperometría de redisolución anódica de pulso diferencial [Town y van Leeuwen, 2001].

La sensibilidad de una técnica viene definida por su capacidad para discriminar la señal analítica de la señal de fondo. En los métodos electroquímicos, esta sensibilidad depende de la capacidad de discriminación entre la señal o corriente faradaica (provocada por la reacción de óxido-reducción que tiene lugar en el electrodo) y la capacitiva (que se debe a que el electrodo se comporta como un condensador, debido a los cambios de potencial que se aplican en el sistema). En SCP, la curva original obtenida de los datos de potencial (E) frente a tiempo (t) tiene una pendiente que, en ausencia de proceso faradaico, viene determinada por la capacitancia del electrodo; esta pendiente se modificará en presencia de especies capaces de ser adsorbidas en el electrodo. Trabajos previos sobre esta técnica destacaron la dificultad de obtener medidas fiables de tiempos de redisolución utilizando los datos directos de E frente a t , puestos que están influenciados por la corriente capacitiva [Rodgers y Meites, 1968; de Vries, 1968; Olmstead y Nicholson, 1968]. El primer intento de transformar estas curvas consistió en medir el tiempo de redisolución como la distancia entre picos consecutivos en una gráfica de dE/dt frente a t [Jagner y Arén, 1978; Schulze y Bönigk, 1985; Tutunji, 1996]. Sin embargo, esta opción no presentaba ventaja alguna puesto que la corriente capacitiva seguía contenida en la señal medida. La estrategia más adecuada fue determinar los tiempos de redisolución midiendo el área bajo el pico en las gráficas de dt/dE frente a E . Esto es lo que se utiliza en los trabajos más recientes. Se usa dt/dE para denotar la inversa de la derivada del potencial respecto al tiempo, de manera que se elimina la influencia de la corriente capacitiva. En la representación de dt/dE frente a E , el área bajo el pico corresponde al tiempo necesario para que se produzca el proceso faradaico de oxidación, mientras que el área bajo la línea base es el tiempo en el que se carga la doble capa, es decir, corresponde a la corriente capacitiva [Town y van Leeuwen, 2001; Town y van Leeuwen, 2002]. En la Figura 3.2 se muestra una representación esquemática de las curvas que se obtienen en SCP, según estas opciones. Además, en la Figura 3.3 puede distinguirse claramente la contribución de la señal capacitiva en las curvas obtenidas en SCP, utilizando la última opción.

Por lo tanto, una de las ventajas de la SCP frente a la ASV es la eliminación de la interferencia de la corriente capacitiva, lo cual evita las dificultades asociadas con la forma de los picos y las interferencias de fondo, que siguen suponiendo un problema en ASV.

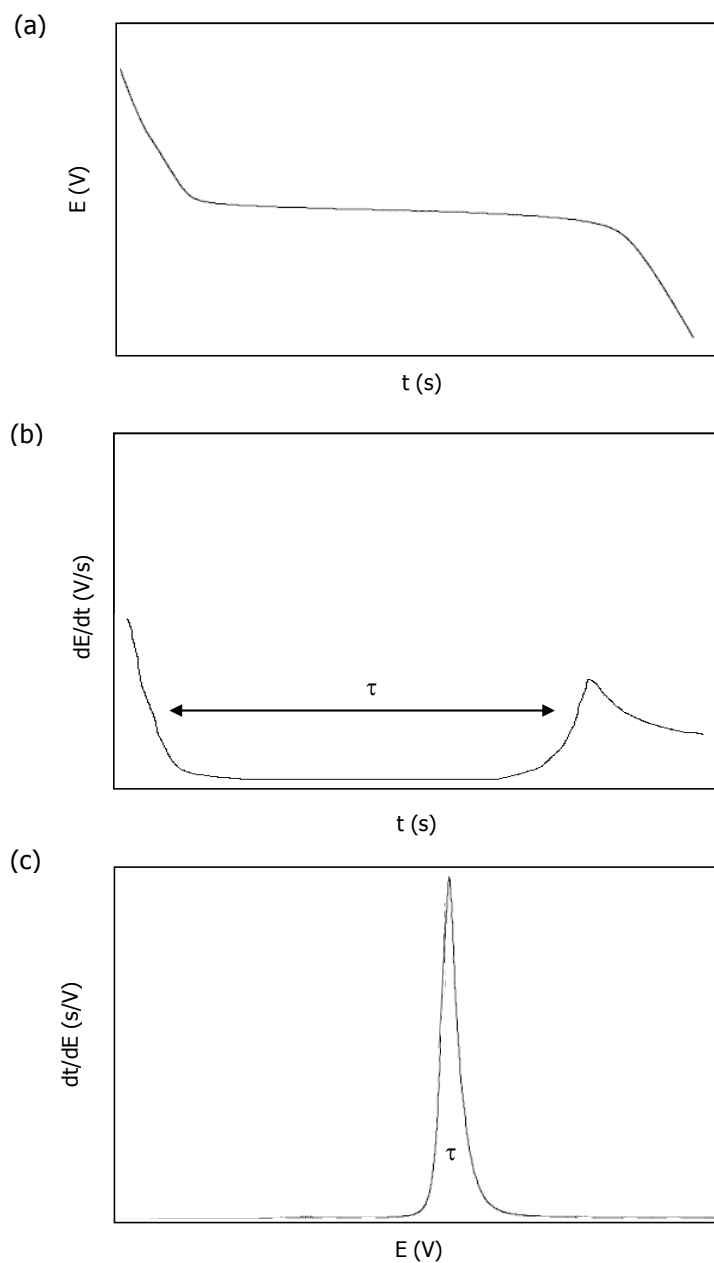


Figura 3.2. Representación esquemática de la señal registrada para: (a) SCP directa (E vs. t), (b) su correspondiente derivada (dE/dt vs. t) (τ : distancia entre picos) y (c) su derivada inversa (dt/dE vs. E) (τ : área bajo la curva) [Town y Van Leeuwen, 2001]

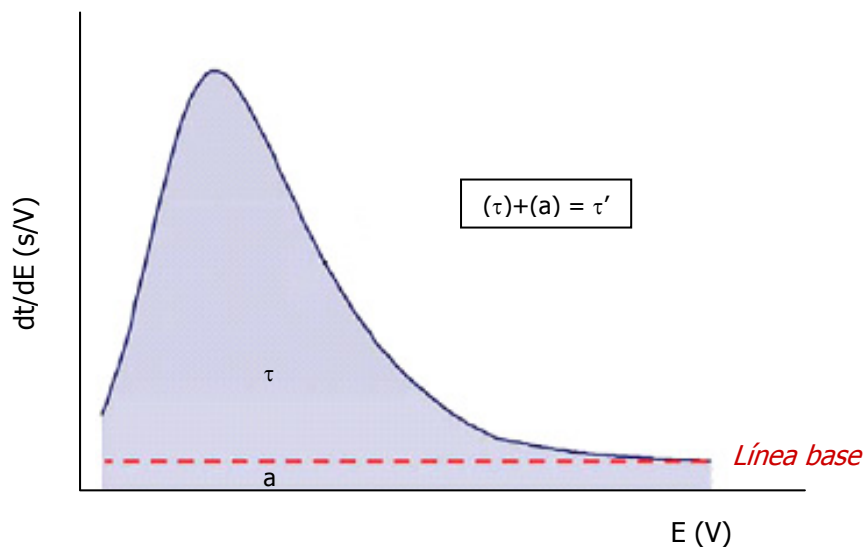


Figura 3.3. Curva SCP (dt/dE frente a E) (τ' : área sombreada total ($\tau+a$); τ (área por encima de la línea base): contribución de la corriente faradaica; a (área bajo la línea base): contribución de la corriente capacitiva)

Otra ventaja frente a la técnica voltamperométrica de redisolución anódica (ASV) es que la SCP es menos susceptible a interferencias por adsorción de compuestos orgánicos. Como se ha comentado previamente, la ASV es una excelente técnica para determinar concentraciones de metales traza en disolución, pero tiene la desventaja de que presenta problemas cuando se aplica a matrices medioambientales que contienen altos niveles de materia orgánica, principalmente debido a la adsorción de diferentes especies sobre la superficie del electrodo. En ambas técnicas, la etapa de deposición se lleva a cabo normalmente a valores más bajos que el potencial de carga cero (pzc) del electrodo de trabajo (que suele ser el electrodo de mercurio). Esto significa que durante la etapa de deposición, el electrodo está cargado negativamente, por lo que la adsorción de ligandos (que normalmente presentan una carga negativa) es despreciable. Sin embargo, la acumulación de exceso de ligando en la superficie del electrodo, y la subsiguiente adsorción del complejo se considera que comienza al inicio del proceso de redisolución, cuando los potenciales aplicados son mayores que el pzc y la carga del electrodo es positiva [Town y van Leeuwen, 2002].

Estos efectos secundarios dificultan la aplicación tanto de la ASV como de la SCP en régimen de difusión lineal semi-infinita para estudiar la complejación de metales. La posible saturación del electrodo por la presencia de compuestos orgánicos durante la etapa de

redisolución resulta en un incremento en la altura de los picos, así como una distorsión de los mismos [Town y van Leeuwen, 2002; van Leeuwen y Town, 2002a]. Además, si la materia orgánica presente en la muestra es heterogénea, se producirá un aumento de la anchura del pico [van Leeuwen y Town, 2003a]. En SCP en régimen de redisolución completa, los tiempos de transición son generalmente del orden de 10^2 s, suficientemente altos como para que la difusión del ligando adsorbido hacia la superficie del electrodo sea rápida en comparación con la velocidad de reoxidación del metal. Por tanto, en este régimen, los ligandos no estarán adsorbidos en la gota tanto tiempo y no producirán efectos negativos en la medida. Por el contrario, en SCP con régimen de difusión lineal semi-infinita, los tiempos de transición son más cortos, del orden de 1 s y el ligando no habrá tenido suficiente tiempo para difundir y todavía estará en la gota durante la medida [Town y van Leeuwen, 2002].

Se han desarrollado numerosas estrategias para solucionar este tipo de interferencias producidas por la adsorción de materia orgánica. Las más comunes implican una modificación de la superficie del electrodo, como puede ser el revestimiento con un polímero (ej. Nafion® [Murimboh y col., 2000; Hurst y Bruland, 2005; Cao y col., 2006] o acetato de celulosa [Christensen y Hoyer, 2000]). Sin embargo, es especialmente complicada la modificación del electrodo de manera reproducible y bien caracterizada. Además, dado que los materiales utilizados están cargados negativamente (ej. Nafion®), éstos confieren al electrodo un carácter de intercambiador iónico, que puede perturbar el equilibrio original y crear problemas en la interpretación de datos.

Existe además una limitación de la técnica SCP relacionada con la presencia de especies oxidantes en la muestra. Teóricamente, el tiempo de redisolución debería aumentar continuamente a medida que la corriente de redisolución I_s disminuye; sin embargo, en la práctica existe una limitación para el aumento de τ que viene determinada por la concentración de trazas de oxígeno disuelto (u otros oxidantes). La presencia de este tipo de compuestos produce un descenso notorio del tiempo que se necesita para oxidar el analito, especialmente cuando los procesos son demasiado largos. Para valores bajos de I_s se observa una contribución relativamente significativa del oxígeno en el proceso de oxidación; sin embargo, esta contribución puede considerarse despreciable si se trabaja con corrientes mayores, aunque se perdería sensibilidad y resolución [Town y van Leeuwen, 2001].

La técnica SCP se puede realizar con diferentes tipos de electrodos de mercurio. Así, muchas aplicaciones de SCP han sido llevadas a cabo utilizando un electrodo de película fina de mercurio (TMFE). Con este electrodo, el rápido transporte de metal a través de la capa durante la etapa de redisolución implica que las medidas se producen bajo condiciones de redisolución completa. Sin embargo, las películas finas de mercurio son mucho menos reproducibles que las gotas.

La ASV con el electrodo de gota de mercurio (HMDE) opera bajo condiciones de difusión lineal semi-infinita [Bard y Faulkner, 2001], es decir, la redisolución completa del metal amalgamado no se alcanza durante la etapa de redisolución. En SCP dependiendo del valor de la corriente de redisolución aplicada, las condiciones varían entre redisolución completa y difusión lineal semi-infinita. Así, el uso de gotas de mercurio de radio pequeño proporciona una difusión lineal semi-infinita para tiempos cortos.

La forma de la curva SCP de E frente a t para el sistema reversible $M^{n+}/M^0(\text{Hg})$ viene determinada básicamente por la ecuación de Nernst en la superficie del electrodo:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \left(\frac{c_M^0}{c_{M^0}^0} \right) \quad (3.1)$$

donde c_M^0 y $c_{M^0}^0$ son las concentraciones del ion metálico y el metal reducido en la superficie del electrodo, respectivamente, n es el número de electrones implicados en el proceso faradaico, R es la constante de los gases, T es la temperatura y F , la constante de Faraday. Para entender rigurosamente la forma de la curva de redisolución, se debe tener en cuenta la dependencia del tiempo respecto a las concentraciones de las especies oxidadas y reducidas en la superficie del electrodo [van Leeuwen y Town, 2002c].

Considerando el caso más simple de una disolución que contenga únicamente iones metálicos, los flujos que están implicados durante el proceso de redisolución son el correspondiente a M^0 desde el interior del electrodo hasta su superficie, y el de M^{n+} desde la superficie del electrodo hasta el seno de la disolución. Cuando se aplica una corriente de redisolución pequeña (modo de redisolución completa), la concentración de metal reducido en la superficie del electrodo $c_{M^0}^0$ se asemeja a la concentración de metal reducido en el interior $c_{M^0}^*$, y esta situación permanecerá así durante todo el periodo de transición, puesto que ambas concentraciones van a ir disminuyendo de manera casi lineal con el tiempo por mantener la corriente impuesta. Es importante destacar que para tiempos de transición próximos a redisolución completa, la corriente debe ser tan baja que $(c_{M^0}^* - c_{M^0}^0)/c_{M^0}^*$ sea mucho menor que la unidad, es decir,

$$c_{M^0}^*/c_{M^0}^0 \approx 1 \quad (3.2)$$

De esta manera, $c_{M^0}^*$ irá disminuyendo continuamente durante el tiempo de transición, hasta llegar a un valor cercano a cero. Cuando se alcanza el estado estacionario, el valor de c_M^0 permanecerá aproximadamente constante en el tiempo debido a que la corriente aplicada genera un gradiente constante de M^{n+} y además, el volumen de la disolución es lo

suficientemente grande como para garantizar una concentración constante de c_M^* [van Leeuwen y Town, 2002c].

La evolución de las concentraciones durante la etapa de redisolución puede observarse en la Figura 3.4.

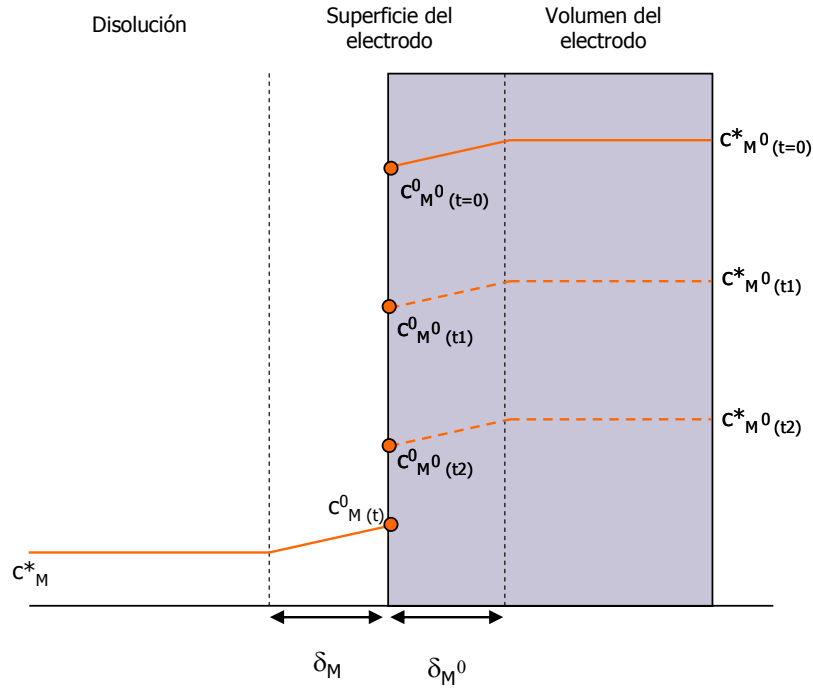


Figura 3.4. Representación esquemática de los perfiles de concentración durante la etapa de redisolución en SCP, aplicable para electrodos de HMDE (δ_M : espesor de la capa de difusión creada entre la superficie del electrodo y el seno de la disolución; δ_M^0 : espesor de la capa de difusión creada entre la superficie del electrodo y el interior del mismo) [Van Leeuwen y Town, 2002c]

Por lo tanto, para valores bajos de I_s , el término logarítmico de la ecuación (3.1) contiene un valor prácticamente constante en el numerador (c_M^0) y un término dependiente del tiempo en el denominador ($c_{M^0}^0 \approx c_{M^0}^*$, que es proporcional a $\tau - t$).

Durante la etapa de redisolución, la concentración de M^{n+} en la superficie c_M^0 viene definida según una corriente de redisolución, que es constante [van Leeuwen y Town, 2002c]:

$$c_M^0 = c_M^* + \frac{I_s \delta_M}{nFAD_M} \quad (3.3)$$

donde A es el área de la superficie del electrodo, δ_M es el espesor de la capa de difusión y D_M , el coeficiente de difusión del metal. Esta concentración de ión metálico en la superficie del electrodo llegará a un valor constante tras alcanzarse el estado estacionario, que para un electrodo HMDE se corresponde con tiempos cortos de aproximadamente 20 s [Town y van Leeuwen, 2002] o mucho menos para un microelectrodo [van Leeuwen y Town, 2002a].

El perfil de concentración de M^0 dentro del electrodo alcanzará un valor límite cuando δ_{M^0} sea igual al radio de la gota (r_{gota} para HMDE), o al espesor de la película (d) o al radio de la microgota (r_o), dependiendo del tipo de electrodo empleado.

Si se ignoran las pequeñas diferencias existentes entre $c_{M^0}^0$ y $c_{M^0}^*$, se tiene la siguiente ecuación para la disminución de $c_{M^0}^0$ con el tiempo:

$$c_{M^0}^0 \approx c_{M^0}^* = \frac{I_d t_d}{nFV} (1 - t/\tau) \quad (3.4)$$

ecuación que expresa la eliminación continua de M^0 del electrodo, pasando a la disolución. La redisolución será completa cuando $t=\tau$ (donde I_d es la corriente de deposición, t_d es el tiempo de deposición y V es el volumen del electrodo).

Así, la redisolución completa implica que el número de moles depositados en la gota es igual al número de moles que se reoxidarán durante el proceso de redisolución:

$$N_{depositados} = \frac{I_d t_d}{nF}; N_{oxidados} = \frac{I_s \tau}{nF} \quad (3.5)$$

$$I_d t_d = I_s \tau$$

donde I_d es la corriente de deposición, I_s es la corriente de redisolución, t_d es el tiempo de deposición y τ es el tiempo de transición (señal analítica).

Combinando las Ecuaciones (3.3), (3.4) y (3.5) con la ecuación de Nernst (3.1), en la cual el potencial aplicado E es, en este caso, el potencial de deposición E_d , se obtiene:

$$\frac{nF}{RT} (E_d - E^0) = \ln \left(\frac{c_M^* + I_s \delta_M / nFAD_M}{I_s (\tau - t) / nFV} \right) \quad (3.6)$$

o bien,

$$t = \tau - g \exp(-nF(E_d - E^0) / RT) \quad (3.7)$$

donde el valor de g viene definido como:

$$g = \frac{nFV(c_M^* + I_s \delta_M / nFAD_M)}{I_s} \quad (3.8)$$

Esta es la ecuación que relaciona la concentración metálica en la disolución c_M^* con el tiempo de transición τ que tarda el metal en reoxidarse. Además, se obtiene que la relación entre t y E es una simple relación exponencial asimétrica [van Leeuwen y Town, 2002c], y como consecuencia, la curva dt/dE vs. E tiene una subida muy pronunciada seguida de una caída exponencial (ver Figura 3.2.c).

Posteriormente al desarrollo de la técnica SCP, se avanzó un paso más y se investigó la posibilidad de aplicar un nuevo método, denominado cronopotenciometría de redisolución de barrido (SSCP) para estudiar la especiación metálica, con el objetivo de facilitar la interpretación de los parámetros de complejación.

3.3.2. Fundamentos de la Cronopotenciometría de Redisolución de Barrido

Las curvas SSCP se construyen mediante una serie de medidas de SCP que se realizan a diferentes valores de potencial de deposición. De esta forma, las curvas SSCP son representaciones de los valores de tiempo de transición τ , obtenidos como el área del pico bajo la curva SCP frente al potencial de deposición E_d . Cada una de esas curvas SCP se obtiene en dos etapas: en la primera, se fija un potencial de deposición durante un tiempo de deposición t_d , para que se reduzca el metal presente en la muestra; y en la segunda etapa, se aplica una corriente oxidante hasta que se reoxida el metal.

A continuación, se explican los aspectos teóricos más importantes de la técnica SSCP bajo condiciones de redisolución completa, que es el régimen utilizado en las investigaciones realizadas en esta tesis. Se comenzará por la deducción de la expresión más sencilla que se utiliza en SSCP (caso de un sistema que contenga solo metal), y luego se presentará la expresión para el caso de que exista un ligando en la muestra, diferenciando entre ligando lábil con tamaño similar al del metal, ligando lábil con tamaño mayor al del metal, y ligando no lábil. Por último se indicará la respuesta que se obtiene si los ligandos presentes en la muestra son heterogéneos.

3.3.2.1. Expresión para la curva SSCP en el caso de una muestra que solo contenga metal

Van Leeuwen y Town publicaron en 2002 [van Leeuwen y Town, 2002b] la deducción detallada de la expresión para la curva SSCP de τ frente a E_d . En esta sección se describirán los puntos más importantes de la explicación.

Según una aproximación basada en la teoría de la capa de difusión en estado de equilibrio, para un potencial dado, la corriente de deposición I_d en un electrodo esférico con radio r_o viene definida por [Bard y Faulkner, 2001]:

$$I_d = nFAD_M(c_M^* - c_M^0) \left(\frac{1}{\delta_M} + \frac{1}{r_o} \right) \quad (3.9)$$

Para una electrodo macroscópico, con $r_o \gg \delta_M$, el término esférico $1/r_o$ desaparece y el flujo es controlado por la difusión en la interfase electrodo-disolución. Para un microelectrodo, con $r_o \ll \delta_M$, el término $1/\delta_M$ desaparece, y es el término de difusión radial el que controla el flujo.

El parámetro δ_M se puede definir como un parámetro proporcional a una constante γ que depende de las condiciones hidrodinámicas que se tienen durante el proceso de deposición, como son la agitación y la geometría de la celda, y que se puede expresar como función del coeficiente de difusión [Rocha y col., 2007]:

$$\delta_M = \gamma D_M^{1/3} \quad (3.10)$$

La corriente límite de deposición I_d^* se obtiene para potenciales de deposición muy negativos, en los que c_M^0 es prácticamente 0 a lo largo de la etapa de deposición:

$$I_d^* = nFAD_M c_M^* \left(\frac{1}{\delta_M} + \frac{1}{r_o} \right) \quad (3.11)$$

Para una reacción de transferencia de electrones reversible como es la de $M \pm ne^- \rightleftharpoons M^0$, existe una relación entre las concentraciones de M y M^0 (ecuación (3.1)) que puede expresarse en términos de θ (cociente de concentraciones en la superficie):

$$\theta = \frac{c_M^0}{c_{M^0}^0} = \exp \left(\frac{nF}{RT} (E_d - E^0) \right) \quad (3.12)$$

Durante la etapa de deposición, la concentración de metal reducido en el electrodo va aumentando desde 0 en $t=0$ hasta valores muchos más altos que c_M^* en $t=t_d$, debido a la preconcentración que se consigue al pasar el metal del seno de la disolución al interior de

la gota. Esto tiene como consecuencia que en el régimen de redisolución completa, la concentración de metal reducido en la superficie del electrodo es prácticamente la misma que la de metal reducido en el interior del mismo. Esta condición es una característica bastante atractiva puesto que evita el uso de ecuaciones complejas de flujos o gradientes de concentración.

La concentración media de metal reducido en el interior del electrodo durante la etapa de deposición se puede expresar en términos de la integral de la corriente de deposición respecto al tiempo:

$$c_{M^0}^* = \frac{1}{nFV} \int I_d dt \quad (3.13)$$

Sustituyendo la ecuación (3.13) en la (3.12), junto con la expresión del flujo para M (ecuación (3.9)), se obtiene:

$$\theta = \frac{nFV(c_M^* - m_M I_d)}{\int I_d dt} \quad (3.14)$$

siendo m_M el coeficiente de transporte de carga para M en disolución, expresado como:

$$m_M = \frac{(1/\delta_M + 1/r_o)^{-1}}{nFAD_M} \quad (3.15)$$

La ecuación (3.14) es una integral que se resuelve, dando:

$$I_d(t) = I_d^* \exp(-t/\tau_d) \quad (3.16)$$

donde τ_d es una constante característica del proceso de deposición, que depende de θ , que a su vez depende del potencial según la ecuación (3.12), y que se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$\tau_d = \frac{V}{AD_M \theta} \left(\frac{1}{\delta_M} + \frac{1}{r_o} \right)^{-1} \quad (3.17)$$

La carga total Q , transferida durante el proceso de deposición de duración t_d se calcula fácilmente por integración de la ecuación (3.16) desde $t=0$ hasta $t=t_d$. En régimen de redisolución completa, la carga total se relaciona linealmente con el tiempo de transición τ , mediante la corriente de redisolución I_s :

$$Q = \int_0^{t_d} I_d^* \exp(-t/\tau_d) dt = I_s \tau \quad (3.18)$$

Esta característica de la SSCP es muy importante dado que en voltamperometría de redisolución de barrido (SSV) no se obtiene esta relación tan simple entre la carga y la señal analítica. En régimen de redisolución completa, resolviendo la integral se puede escribir Q en términos de τ :

$$\tau = \frac{I_d^* \tau_d}{I_s} [1 - \exp(-t_d / \tau_d)] \quad (3.19)$$

que representa la curva completa SSCP de τ frente a E_d , puesto que el potencial está presente en el parámetro τ_d , según la ecuación (3.12) y (3.17). Es importante destacar que este tipo de aproximación se puede aplicar únicamente a técnicas de redisolución en régimen de redisolución completa.

Para valores de potencial de deposición más negativos que el potencial estándar de reducción, el parámetro θ tiende a 0, y se alcanza el valor límite del tiempo de transición, τ^* . Esto se puede entender considerando τ_d mucho mayor que t_d ($t_d/\tau_d \ll 1$), de manera que el término exponencial de la ecuación (3.19) puede desarrollarse como una serie, en la que pueden despreciarse el tercer término y los siguientes:

$$\tau^* = \frac{I_d^* \tau_d}{I_s} \left[1 - \left(1 - \frac{t_d/\tau_d}{1!} + \frac{(-t_d/\tau_d)^2}{2!} + \dots \right) \right] = \frac{I_d^* t_d}{I_s} \quad (3.20)$$

que es el balance de carga para la redisolución completa [van Leeuwen y Town, 2002b].

En la Figura 3.5 se puede observar la forma de una curva de SSCP típica para la determinación de Pb. Los parámetros que definen la curva son el tiempo de transición límite τ^* y el potencial de semi-onda $E_{1/2}$. El primero proporciona información dinámica/cinética del sistema y depende de los coeficientes de difusión; mientras que el segundo está íntimamente relacionado con el potencial necesario para oxidar o reducir el analito, por lo que aporta datos termodinámicos (constante de formación de los complejos).

3.3.2.2. Expresión para la curva SSCP en el caso de que existan ligandos en la muestra

Para aplicar la técnica de SSCP al estudio de la especiación metálica, es necesario conocer la influencia que tienen los parámetros asociados a la complejación sobre la forma y la posición de las curvas. En este apartado, se considerará la influencia de la constante de estabilidad del complejo metálico, así como los valores de coeficiente de difusión del metal y del ligando.

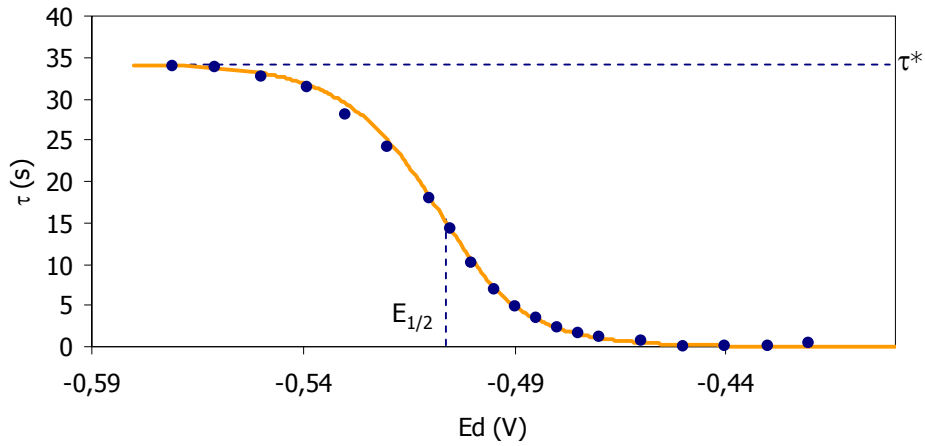


Figura 3.5. Curva típica de SSCP para una disolución de Pb(II) ($1,4 \cdot 10^{-6}$ mol/L) (● valores experimentales; — curva teórica)

Consideremos un esquema sencillo de un ion metálico M que, en presencia de ligando, forma el complejo ML según el siguiente equilibrio:



donde las cargas se omiten para mayor claridad.

La constante de velocidad para la reacción de formación de complejo se denota como k_a y la constante de velocidad para la reacción de disociación se denota como k_d . La relación k_a/k_d se define como la constante termodinámica de estabilidad K de ML [Pinheiro y van Leeuwen, 2004].

$$K = \frac{k_a}{k_d} = \frac{c_{ML}}{c_M c_L} \quad (3.22)$$

donde c_{ML} , c_M y c_L son las concentraciones de complejo, metal y ligando en el equilibrio.

Para concentraciones de ligando en exceso sobre la concentración de metal ($c_{L,Total} \gg c_{M,Total}$; $c_{L,Total} \approx c_L$) la reacción se vuelve quasi-monomolecular con una constante de velocidad:

$$\begin{cases} k'_a = k_a c_{L,T} \\ K' = \frac{k'_a}{k_d} = \frac{k_a c_{L,T}}{k_d} = K c_{L,T} = K c_L = \frac{c_{ML}}{c_M} \end{cases} \quad (3.23)$$

donde el subíndice T denota la concentración total.

K' , constante de estabilidad condicional, es un parámetro que indica la relación existente entre la concentración de metal libre y el complejo. Cuanto mayor sea K' , mayor será la concentración de metal complejo en el medio. En la superficie del electrodo durante el proceso de preconcentración, la concentración de ion metálico en disolución c_M^* es cero porque a medida que llega a la interfase, se va transformando en M^0 .

La concentración de metal complejo en disolución c_{ML}^* , dependerá del equilibrio (3.21) y por tanto de k_a y k_d .

El concepto de labilidad describe la capacidad del complejo de mantener el equilibrio durante el proceso de análisis, en el cual el metal M es consumido en el electrodo según las siguientes reacciones (Figura 3.6):

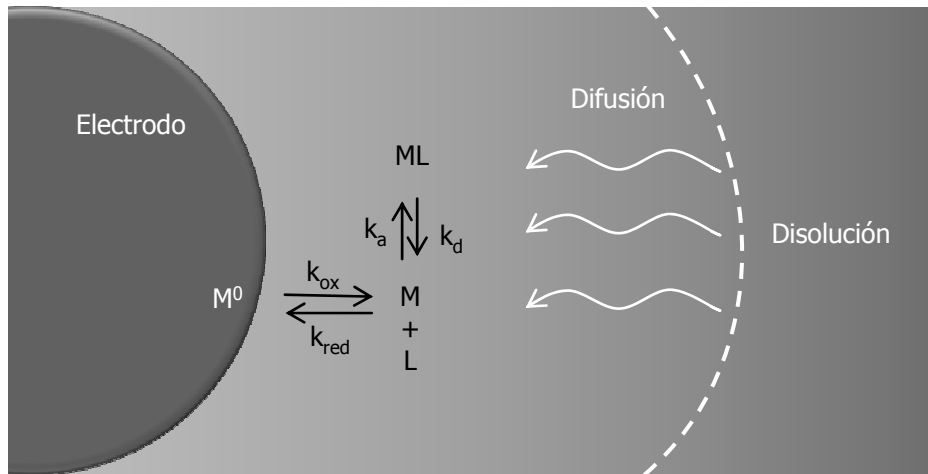


Figura 3.6. Equilibrios entre el metal M y el complejo ML en las proximidades de un electrodo

Por tanto, hay que considerar que la disolución contiene M y ML, y que el proceso de medida consume metal libre M, que afecta al equilibrio de complejación.

Durante el proceso de análisis, los tiempos de vida característicos de las especies metálicas se obtienen a partir de sus constantes de velocidad, según la reacción (3.21). Así, el tiempo de vida del metal es $1/k'_a$, mientras que el del complejo es $1/k_d$. Se define una escala de tiempo t , que corresponde con el tiempo característico que necesita el metal en recorrer la capa de difusión δ [van Leeuwen, 2001].

Tal y como se explicó anteriormente, los sistemas pueden considerarse como estáticos o dinámicos:

En el caso de que $k'_a t$ y $k_d t \ll 1$, los tiempos de vida de M y ML serán mayores que el tiempo que necesitan estas especies para difundir a través de la capa, por lo que el equilibrio no se restablece mientras el metal se consume en el análisis, el complejo no puede disociarse a medida que difunde hacia el electrodo, y se define como inerte. En este caso, el potencial de semi-onda será el mismo que en el caso de metal libre. Lo único que se puede detectar cuando el complejo es inerte, será la concentración de metal libre [Pinheiro y col., 2006].

Ahora bien, cuando $k'_a t$ y $k_d t \gg 1$, los tiempos de vida de M y ML son más cortos que el tiempo en el que recorren la capa de difusión, por tanto, durante el análisis el equilibrio se restablece y el sistema es dinámico [Pinheiro y col., 2006]. En este caso, pueden describirse dos condiciones extremas: que el complejo sea lábil o no lábil [Mota y col., 2012]. Para diferenciar estos dos tipos de complejos, se puede hacer referencia a los flujos que entran en juego en la capa de difusión: el cinético y el de difusión.

- El flujo de difusión: $J_d = \frac{\bar{D}c_{M,T}}{\delta}$

- El flujo cinético: $J_c = \frac{k_d c_{ML}}{\mu}$

donde \bar{D} es el coeficiente de difusión promedio del metal (en presencia de ligando), δ es el espesor promedio de la capa de difusión (en presencia de ligando), $c_{M,T}$ es la concentración total de metal (tanto libre como complejo), y μ se define como el espesor de la capa cinética de reacción, definida en términos de movilidad (D_M) y tiempo de vida del metal ($1/k'_a$), siendo igual a [van Leeuwen y col., 2005]:

$$\mu = \sqrt{\frac{D_M}{k'_a}} \quad (3.24)$$

El parámetro μ puede definirse como el espacio que pueden recorrer las especies presentes (M y ML) por difusión sin que se produzca interconversión entre ellas debido a su equilibrio dinámico. Así, si $\mu \ll \delta$, el espacio que recorren las especies sin sufrir esta interconversión es pequeño, y durante su acercamiento hacia el electrodo el complejo se disocia fácilmente, por lo que el sistema es lábil y la relación entre sus concentraciones siempre vendrá definida por K' . La etapa controlante será el proceso de difusión, por lo que $J_d < J_c$.

Por el contrario, si el valor de μ es próximo al valor de δ , las especies pueden recorrer gran parte de la capa de difusión sin llegar a restablecerse el equilibrio, lo que implica que el sistema es no lábil y $J_d \approx J_c$.

Así, y según la aproximación de Koutecký-Koryta [Koutecký y Koryta, 1961], existen dos regiones espaciales dentro de la capa de difusión, una lábil y otra no lábil (Figura 3.7).

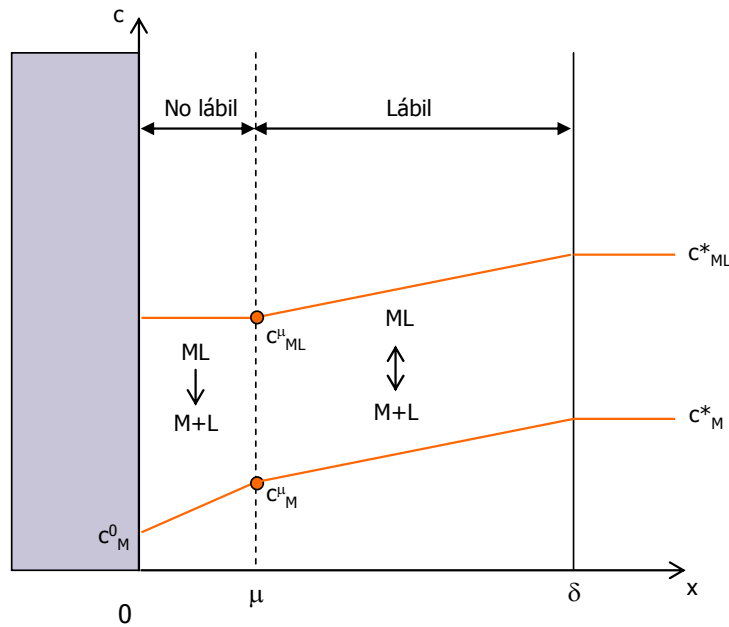


Figura 3.7. Esquema de los perfiles de concentración de M y ML en función de la distancia x desde la superficie del electrodo (c_M^0) hacia la disolución (μ : espesor de la capa cinética de reacción) [van Leeuwen y col., 2005]

Estas dos regiones están definidas por el espesor de la capa de reacción μ . Desde la superficie del electrodo ($x=0$) hasta μ no existe intercambio dinámico alguno entre el metal libre y el complejoado, y la contribución de ML es puramente cinética. Desde μ hasta δ existe

un equilibrio entre las dos especies y el sistema es lábil [Ferreira Domingos, 2006]. Para cualquier tamaño de electrodo los flujos vendrán dados por las siguientes ecuaciones [van Leeuwen y Town, 2004]:

- El flujo de M desde $x=0$ hasta $x=\mu$ es: $J = \frac{D_M(c_M^\mu - c_M^0)}{\mu}$
- El flujo de M y ML desde $x=\mu$ hasta $x=\delta$ es: $J_\mu = \frac{\bar{D}(c_{M,T}^* - c_{M,T}^\mu)}{\bar{d} - \mu}$, siendo

$$\bar{d} = \left(\frac{1}{\delta} + \frac{1}{r_0} \right)^{-1}$$

El espesor de la capa cinética de reacción solo tiene sentido físico cuando es menor que la capa de difusión. Si $\mu = \delta$, significaría que no existe disociación en toda la capa de difusión y por lo tanto el sistema sería inerte.

Una vez definidos los sistemas que se pueden encontrar en una muestra medioambiental, se expondrán las ecuaciones que rigen la técnica SSCP para cada uno de los casos siguientes: (a) sistema lábil con ligando pequeño, (b) sistema lábil con ligando grande, (c) sistema no lábil y (d) sistema con ligandos heterogéneos.

(a) Sistema lábil con ligando de pequeño tamaño ($D_{ML} = D_M$)

En el caso de que el ligando que compleje al metal sea pequeño, entonces los coeficientes de difusión del metal y del complejo serán similares y por ello, el tiempo de transición límite del metal será igual al tiempo de transición límite del metal en presencia de ligando; sin embargo el parámetro $E_{1/2}$ se verá modificado puesto que existirá un equilibrio entre el metal y el complejo y será necesario aplicar más energía para desplazarlo. Por ello, cuando el sistema es lábil, la altura de la curva SSCP no variará con respecto a la del metal en ausencia de ligando, pero estará desplazada hacia valores de potencial más negativos [van Leeuwen y Town, 2002b].

La influencia de este desplazamiento puede explicarse con la siguiente deducción para casos de complejos lábiles:

$$\begin{cases} c_{M,T}^0 = c_M^0 + c_{ML}^0 \\ K' = \frac{c_{ML}^0}{c_M^0} \end{cases} \quad (3.25)$$

Si se divide la expresión anterior de la concentración entre c_M^0 , se tiene que

$$\frac{c_{M,T}^0}{c_M^0} = \frac{c_M^0}{c_M^0} + \frac{c_{ML}^0}{c_M^0} = 1 + K' \quad (3.26)$$

$$c_M^0 = \frac{c_{M,T}^0}{1 + K'} \quad (3.27)$$

Con lo cual,

$$\theta = \frac{c_M^0}{c_{M^0}^0} = \frac{c_{M,T}^0}{(1 + K')c_{M^0}^0} \quad (3.28)$$

con la correspondiente modificación de la ecuación (3.1):

$$E_d = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln(1 + K') + \frac{RT}{nF} \ln\left(\frac{c_{M,T}^0}{c_{M^0}^0}\right) = E^{0'} + \frac{RT}{nF} \ln\left(\frac{c_{M,T}^0}{c_{M^0}^0}\right) \quad (3.29)$$

En presencia de ligando, se introduce un factor nuevo K' que afectará a θ y por tanto, a la curva SSCP [van Leeuwen y Town, 2002b]. Combinando la ecuación (3.28) con la (3.29) se obtiene una expresión para θ en función del potencial, que es la que se cumple también para el caso de metal sin ligando:

$$\theta = \exp\left(\frac{nF}{RT} (E_d - E^0)\right) \quad (3.12)$$

siendo

$$E_d - E^0 = -\frac{RT}{nF} \ln(1 + K') + \frac{RT}{nF} \ln\left(\frac{c_{M,T}^0}{c_{M^0}^0}\right) = \frac{RT}{nF} \ln\left(\frac{c_{M,T}^0}{(1 + K')c_{M^0}^0}\right) \quad (3.29)$$

Atendiendo a estas expresiones y de forma similar a lo explicado para la ecuación (3.19), la ecuación para la curva SSCP en el caso de complejos lábiles con ligando pequeño, viene dada por la ecuación:

$$\tau_{M+L} = \frac{I_{d,M+L}^* \tau_d}{I_s} [1 - \exp(-t_d / \tau_d)] \quad (3.30)$$

donde el subíndice $M+L$ denotará que en el sistema hay ligando.

En este caso, $I_{d,M+L}^*$ viene definida como

$$I_{d,M+L}^* = nFAD_M c_{M,T}^* \left(\frac{1}{\delta_M} + \frac{1}{r_o} \right) \quad (3.31)$$

y τ_d se expresa de la misma manera que en el caso de sistemas que solo contengan metal (ecuación (3.17)):

$$\tau_d = \frac{V}{AD_M \theta} \left(\frac{1}{\delta_M} + \frac{1}{r_o} \right)^{-1} \quad (3.17)$$

con la diferencia de que en sistemas lábiles el parámetro θ viene definido por la ecuación (3.28).

El factor $\frac{I_{d,M+L}^* \tau_d}{I_s}$ en la ecuación (3.30) no afecta la posición de la curva en el eje x (correspondiente al parámetro E_d) [van Leeuwen y Town, 2002b]. Por lo que, considerando solamente el término exponencial se puede obtener una expresión para el desplazamiento del potencial de semi-onda debido a la formación de complejos ($\Delta E_{d,1/2}$), que es equivalente a la expresión de DeFord-Hume [DeFord y Hume, 1951], y que no depende del tamaño del ligando:

$$\Delta E_{d,1/2} = -\frac{RT}{nF} \left[\ln(1 + K') + \ln(\tau_{M+L}^* / \tau_M^*) \right] \quad (3.32)$$

La mayor ventaja de la técnica SSCP es la posibilidad de calcular las constantes de estabilidad del sistema de estudio. La constante de estabilidad condicional K' puede calcularse mediante la ecuación (3.32) en todas las situaciones dinámicas posibles (complejos lábiles, semi-lábiles o no lábiles).

(b) Sistema lábil con ligando de mayor tamaño ($D_{ML} < D_M$)

Cuando el metal está complejoado con un ligando grande, difunde más lentamente que si está como metal libre. Entonces se define un coeficiente de difusión promedio, que estará comprendido entre D_M y D_{ML} [van Leeuwen y Town, 2002b]:

$$\bar{D} = \frac{c_M^* D_M + c_{ML}^* D_{ML}}{c_{M,T}^*} \quad (3.33)$$

Del sistema de ecuaciones siguiente, se puede obtener la relación entre \bar{D} y D_M :

$$\begin{cases} \bar{D} = \frac{c_M^* D_M + c_{ML}^* D_{ML}}{c_{M,T}^*} \\ K' = \frac{c_{ML}^*}{c_M^*} \\ c_{M,T}^* = c_M^* + c_{ML}^* \end{cases} \quad (3.34)$$

$$\bar{D} = \frac{1 + (D_{ML} / D_M) K'}{1 + K'} D_M = \frac{1 + \varepsilon K'}{1 + K'} D_M \quad (3.35)$$

donde se define $(D_{ML} / D_M) = \varepsilon$.

Dado que el espesor de la interfase depende del coeficiente de difusión, se define de igual manera un espesor promedio, tal que

$$\bar{\delta} = \sqrt{\pi \bar{D} t} \quad (3.36)$$

que a su vez es proporcional a una constante γ que depende de la agitación y la geometría de la celda [Rocha y col., 2007]:

$$\bar{\delta} = \gamma \bar{D}^{1/3} \quad (3.37)$$

De esta forma, se tiene que en presencia de ligando:

$$I_{d,M+L}^* = n F A \bar{D} c_{M,T}^* \left(\frac{1}{\bar{\delta}} + \frac{1}{r_o} \right) \quad (3.38)$$

$$\tau_{d,M+L} = \frac{V}{A \bar{D} \theta} \left(\frac{1}{\bar{\delta}} + \frac{1}{r_o} \right)^{-1} \quad (3.39)$$

donde θ viene definida por la ecuación (3.12) y (3.28).

Teniendo en cuenta que en ausencia de ligando (ver apartado 3.3.2.1.), la corriente límite de deposición se expresaba como:

$$I_d^* = n F A D_M c_M^* \left(\frac{1}{\delta_M} + \frac{1}{r_o} \right) \quad (3.11)$$

y dado que en estas circunstancias se cumplía que $c_{M,T}^* = c_M^*$, se puede indicar que:

$$I_{d,M}^* = n F A D_M c_{M,T}^* \left(\frac{1}{\delta_M} + \frac{1}{r_o} \right) \quad (3.40)$$

Dividiendo la ecuación (3.38) entre la (3.40), se obtiene:

$$\frac{I_{d,M+L}^*}{I_{d,M}^*} = \frac{\bar{D}}{D_M} \frac{\left(\frac{1}{\delta} + \frac{1}{r_o}\right)}{\left(\frac{1}{\delta_M} + \frac{1}{r_o}\right)} = \frac{\bar{D}}{D_M} \frac{\left(\frac{1}{\gamma \bar{D}^{1/3}} + \frac{1}{r_o}\right)}{\left(\frac{1}{\gamma D_M^{1/3}} + \frac{1}{r_o}\right)} \quad (3.41)$$

Igualmente, y dado que:

$$\tau^* = \frac{I_d^* t_d}{I_s} \quad (3.20)$$

y que t_d e I_s son las mismas en ausencia y presencia de ligando, se tiene que

$$\frac{\tau_{M+L}^*}{\tau_M^*} = \frac{I_{d,M+L}^* t_d / I_s}{I_{d,M}^* t_d / I_s} = \frac{I_{d,M+L}^*}{I_{d,M}^*} \quad (3.42)$$

por lo que, teniendo en cuenta la ecuación (3.35), se obtiene:

$$\frac{\tau_{M+L}^*}{\tau_M^*} = \frac{\bar{D}}{D_M} \frac{\left(\frac{1}{\delta} + \frac{1}{r_o}\right)}{\left(\frac{1}{\delta_M} + \frac{1}{r_o}\right)} = \frac{\bar{D}}{D_M} \frac{\left(\frac{1}{\gamma \bar{D}^{1/3}} + \frac{1}{r_o}\right)}{\left(\frac{1}{\gamma D_M^{1/3}} + \frac{1}{r_o}\right)} = \frac{1 + \varepsilon K'}{1 + K'} \frac{\left(\frac{1}{\gamma \bar{D}^{1/3}} + \frac{1}{r_o}\right)}{\left(\frac{1}{\gamma D_M^{1/3}} + \frac{1}{r_o}\right)} \quad (3.43)$$

Para un macroelectrodo, donde $1/r_o \ll 1/\delta$, la ecuación se reduce a:

$$\frac{\tau_{M+L}^*}{\tau_M^*} = \left(\frac{\bar{D}}{D_M}\right)^{2/3} = \left(\frac{1 + \varepsilon K'}{1 + K'}\right)^{2/3} \quad (3.44)$$

Ésta sería la máxima diferencia de altura τ^* que existiría entre las curvas SSCP en presencia y ausencia de ligando, siempre que el sistema sea lábil. Para sistemas no lábiles, la diferencia de altura será mucho más acusada.

Si se aplicara esta expresión al caso de ligandos pequeños, para cualquier tipo de electrodo, se cumpliría que $\bar{D} = D_M$ y por tanto, las alturas de ambas curvas serán iguales ($\tau_{M+L}^* = \tau_M^*$), que fue lo que se indicó en el apartado anterior.

La expresión para la curva SSCP en este caso viene dada por la ecuación:

$$\tau_{M+L} = \frac{I_{d,M+L}^* \tau_d}{I_s} [1 - \exp(-t_d / \tau_d)] \quad (3.30)$$

donde $I_{d,M+L}^*$ y τ_d han quedado definidos en las ecuaciones (3.38) y (3.39), respectivamente.

Así, se proponen dos maneras de calcular la K' cuando el sistema es lábil, bien a partir del desplazamiento del potencial de deposición de semi-onda $\Delta E_{d,1/2}$ (ecuación (3.32), que no dependía del tamaño del ligando) o bien a partir del tiempo de transición límite τ^* (ecuación (3.43) o (3.44)).

Si el sistema no es completamente lábil, la concentración de metal reducido en el interior del electrodo c_M^* es menor que en sistemas totalmente lábiles, y por tanto, también será menor τ_{M+L}^* . En este caso de no labilidad, no es posible calcular la constante utilizando la variación del tiempo de transición límite (ecuación (3.43)), puesto que su aplicación proporcionará una sobreestimación de K o incluso valores negativos de la constante.

(c) Sistemas no lábiles

En este caso, entra en juego el parámetro μ , y la corriente límite de deposición vendrá dada por [Ferreira Domingos, 2006]:

$$I_{d,M+L}^* = nFAC_M^* \left(\frac{\bar{d} - \mu}{\bar{D}(1 + K')} + \frac{\mu}{D_M} \right)^{-1} \quad (3.45)$$

donde c_M^* es la concentración de metal sin complejar en el seno de la disolución.

Igualmente, τ_d también se ve modificada:

$$\tau_d = \frac{V}{A\theta} \left(\frac{\bar{d} - \mu}{\bar{D}(1 + K')} + \frac{\mu}{D_M} \right) \quad (3.46)$$

donde θ viene definida por la ecuación (3.12) y (3.28).

Estas dos últimas expresiones se pueden usar de manera general, tanto si el sistema es lábil como si no lo es, de manera que si es lábil, $\mu \ll \bar{d}$, por lo que μ puede despreciarse y el segundo término dentro del paréntesis en (3.45) y (3.46) desaparece. En

este caso, dado que $c_M^*(1 + K') = c_{M,T}^*$ y que $\bar{d} = \left(\frac{1}{\delta} + \frac{1}{r_o} \right)^{-1}$, se tiene la siguiente ecuación:

$$I_{d,M+L}^* = nFAC_M^* \left(\frac{\bar{d}}{\bar{D}(1 + K')} \right)^{-1} = \frac{nFAC_M^* \bar{D}(1 + K')}{\bar{d}} = \frac{nFAC_{M,T}^* \bar{D}}{\bar{d}} = nFADc_{M,T}^* \left(\frac{1}{\delta} + \frac{1}{r_o} \right) \quad (3.47)$$

que es la que se obtuvo anteriormente para el caso de complejos lábiles (3.38).

De esta forma, se obtendría una ecuación teórica para la curva SSCP que sería aplicable tanto para sistemas lábiles como no lábiles:

$$\tau = \frac{I_d^* \tau_d}{I_s} [1 - \exp(-t_d / \tau_d)] \quad (3.19)$$

donde I_d^* y τ_d han sido definidas en las ecuaciones (3.45) y (3.46).

La labilidad del sistema podrá ser estudiada mediante el cálculo y la comparación del valor de K' obtenido a partir de $\Delta E_{d,1/2}$ (ecuación (3.32)) y el valor de K' obtenido a partir de τ^* (ecuación (3.43) o (3.44)); o bien mediante el cálculo del parámetro μ y su comparación frente al valor de \bar{d} [Ferreira Domingos, 2006].

(d) Sistemas en presencia de ligandos heterogéneos

Es frecuente encontrar en la naturaleza ligandos complejantes que muestran efectos polifuncionales, polielectrostáticos y conformacionales, debido a su variedad de grupos funcionales, a su alta densidad de carga y a su estereoquímica, respectivamente. Este tipo de ligandos presentan heterogeneidades puesto que contienen una gran variedad de grupos funcionales complejantes, los cuales actúan de diferente manera en la complejación del metal. Por ello, en los sistemas de complejos metálicos con ligandos heterogéneos, existirán varios coeficientes de difusión del complejo [Town y van Leeuwen, 2002].

SSCP es una técnica que permite también identificar la presencia de ligandos heterogéneos [Buffle, y col., 1987; Town, 2008]. De hecho, la presencia de sustancias como ácidos fúlvicos o húmicos causa una disminución de la altura de la curva SSCP y un ensanchamiento de la misma a lo largo del eje x (E_d) en comparación con la obtenida con un sistema homogéneo [Van Leeuwen y Town, 2003a]. En muestras donde existen complejos con ligandos heterogéneos, la ecuación (3.32) no puede aplicarse debido a que no se conoce con exactitud el coeficiente de difusión medio \bar{D} , pero su variación permite identificar la presencia de este tipo de ligandos. Los ligandos heterogéneos tienen tamaños muy diversos y desconocidos, por lo que una sola constante de estabilidad condicional no puede describir la fuerza de los diferentes enlaces que pueden producirse entre el metal y el ligando.

3.4. Fundamentos teóricos de la técnica AGNES

Galceran y col. han propuesto recientemente una nueva técnica de redisolución para la determinación de la concentración de metal libre: AGNES (*Absence of gradients and Nernstian equilibrium stripping* o Redisolución en ausencia de gradiente y en equilibrio Nernstiano) [Galceran y col., 2004]. Esta técnica consiste en la aplicación de dos etapas fundamentales:

- Una etapa de deposición del metal presente en la disolución hacia un electrodo de mercurio en la que se alcanza una situación de equilibrio con ausencia de gradientes en los perfiles de concentración de todas las especies, y un equilibrio Nernstiano del par redox en la superficie del electrodo.
- Una etapa de redisolución y cuantificación del metal reducido y acumulado en la amalgama de mercurio.

La etapa de deposición consta de un período con agitación y otro sin agitación, y la etapa de redisolución, en la que se lleva a cabo la medida, se realiza en ausencia de agitación.

La respuesta analítica que proporciona esta técnica después de aplicar un programa de potencial en la etapa de deposición es la intensidad de corriente. La concentración del metal amalgamado y la corriente de redisolución faradaica son proporcionales a la concentración de metal libre en la disolución.

AGNES puede aplicarse mediante dos metodologías para la primera etapa, denominadas AGNES de un pulso (AGNES 1P) y AGNES de dos pulsos (AGNES 2P). Sus principales diferencias radican en el número de subetapas de deposición y en los tiempos necesarios [Chito Trujillo, 2012]. En la Figura 3.8 se representan de forma general los programas de potencial que tienen lugar en AGNES 1P y AGNES 2P.

A continuación se explicará con más detalle cómo transcurren las etapas en las que se basa la técnica AGNES.

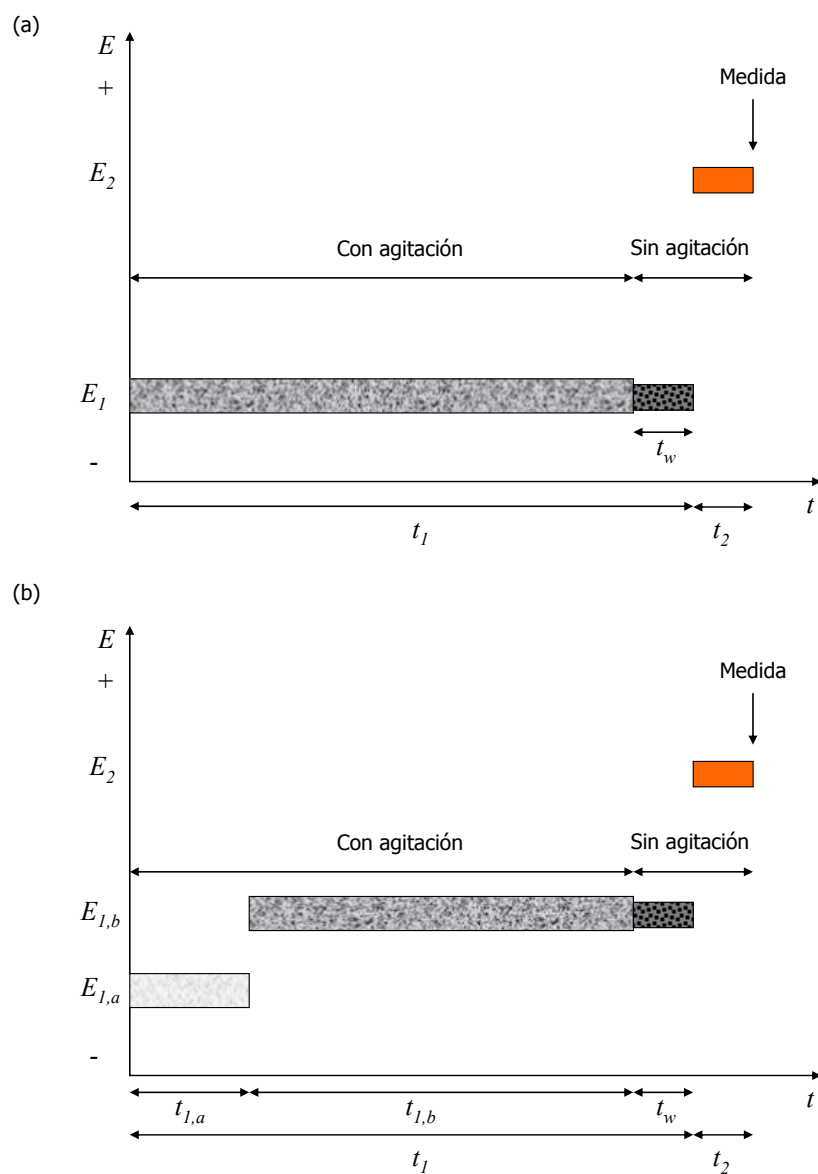


Figura 3.8. Esquema del programa de potencial y agitación en AGNES: (a) AGNES 1P, (b): AGNES 2P [Comanys y col., 2005; Galceran y col., 2007]

1. Primera etapa: *preconcentración hasta alcanzar ausencia de gradiente de concentración manteniendo el equilibrio Nernstiano en la superficie del electrodo.*

Consiste en una deposición o preconcentración del metal hasta que se alcanza la ausencia de gradiente de concentración a ambos lados de la superficie del electrodo, mientras se mantiene constante la relación del par electroactivo según el equilibrio de Nernst. En este paso se asume que el electrodo de mercurio tiene un volumen mucho más pequeño que el de la disolución con la que está en contacto. Esta disolución contiene un ion metálico M , cuya forma reducida M^0 se disolverá en el mercurio formando una amalgama. Durante la etapa de deposición se produce la siguiente reacción en el sistema:



En esta etapa, se aplica un potencial constante de reducción (que se denota por E_1 y es unos milivoltios más negativo que el potencial estándar del par redox) durante un tiempo suficientemente largo t_1 , agitando durante un tiempo t_1-t_w , y sin agitación durante el tiempo de reposo t_w . Al final de esta etapa, el flujo de metal que atraviesa la superficie del electrodo se hará cero y las concentraciones de metal a cada lado de la superficie estarán en equilibrio Nernstiano.

En esta técnica se define un nuevo parámetro Y , como la relación que existe entre las concentraciones de metal a ambos lados de la superficie del electrodo en cualquier momento del proceso:

$$Y = \frac{c_{M^0}^0}{c_M^0} \quad (3.49)$$

Cuando los perfiles de concentración consiguen una forma plana (Figura 3.9.a), se alcanza el equilibrio Nernstiano, siendo las concentraciones $c_{M^0}^0$ y c_M^0 iguales a la concentración final de metal reducido dentro de la gota de mercurio $c_{M^0}^*$, y a la concentración de metal presente en la disolución c_M^* respectivamente.

Aplicando la ecuación de Nernst, se tiene:

$$Y = \frac{c_{M^0}^*}{c_M^*} = \exp \left[- \frac{nF}{RT} (E_1 - E^{0'}) \right] \quad (3.50)$$

donde $E^{0'}$ es el potencial formal estándar del par redox. El término Y es, por tanto, el aumento en concentración del metal a través de la superficie, debido a su preconcentración en la amalgama, y está relacionado con el factor $(E_1 - E^{0'})$. Este término no depende de las características del medio (adsorción o complejación) y puede controlarse experimentalmente a través de E_1 . A menos que la transferencia electrónica entre M y M^0

sea extremadamente lenta, por lo general el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio es mucho menor que el que se necesita para llegar a la condición de ausencia de gradiente.

Estrictamente hablando, AGNES mide actividades (puesto que su fundamento está basado en la ecuación de Nernst), sin embargo, esas actividades pueden referirse a concentraciones puesto que la fuerza iónica de las disoluciones estudiadas se fija en un valor constante.

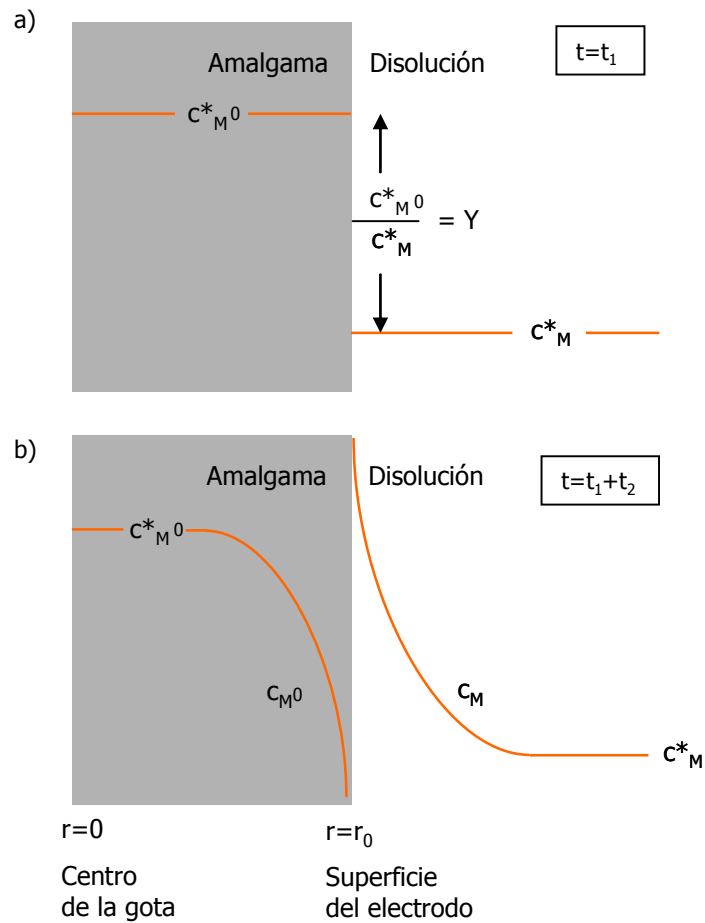


Figura 3.9. Perfil de concentraciones dentro (región gris a la izquierda) y fuera del electrodo de mercurio durante la técnica AGNES: (a) Perfiles al final de la etapa de deposición ($t=t_1$) exhibiendo la ausencia de gradiente y una relación fija (Y) entre las concentraciones de las especies en la interfase; (b) Perfiles durante t_2 en la etapa de redisolución con detección de la I [Galceran y col., 2004]

La duración de esta primera etapa, t_1 , puede verse reducida si se divide en dos sub-etapas, que es lo que ocurre en AGNES 2P [Companyys y col., 2005]:

- (a) Aplicación de un potencial $E_{1,a}$ tal que Y sea suficientemente grande, denominado $Y_{1,a}$ (bajo condiciones de difusión limitada) durante un tiempo $t_{1,a}$ de forma que, al menos, la mayoría de los moles requeridos dentro del electrodo sean proporcionados por el medio.
- (b) Aplicación de un potencial $E_{1,b}$ correspondiente al factor de preconcentración deseado Y (que también puede ser denotado como $Y_{1,b}$) de manera que los perfiles lleguen a ser suficientemente homogéneos después de $t_{1,b}$. Después de aplicar $E_{1,b}$ durante un tiempo $t_{1,b}$ con agitación, existe un periodo sin agitación t_w , para asegurar que se han alcanzado las condiciones requeridas y evitar los posibles efectos de la agitación durante la medida de la corriente en el siguiente paso.

Si se aplica el potencial $E_{1,a}$ durante un tiempo muy largo, entrará en la gota gran cantidad de metal, lo que dará lugar a un exceso de metal dentro del electrodo. En esta situación, para alcanzar las condiciones de ausencia de gradiente y equilibrio Nernstiano se necesitaría aplicar tiempos muy largos durante la segunda sub-etapa ($t_{1,b}$). Se ha demostrado [Companyys y col., 2005] que cuando se trabaja con una concentración de ligando libre constante, si $t_{1,b}=3t_{1,a}$ es suficiente para evitar cualquier exceso de metal y poder llegar a las condiciones de AGNES.

2. Segunda etapa: *determinación de la concentración de metal reducido en la gota.*

Esta etapa se basa en la detección de la concentración de metal $c_{M^0}^*$ que se ha preconcentrado en la gota durante la etapa previa. Para ello, se aplica un potencial E_2 de reoxidación, relacionado con un factor de preconcentración Y_2 , durante un tiempo t_2 , de tal forma que se revierta el proceso (3.48) para obtener:



El potencial que se aplica debe ser suficientemente positivo para garantizar condiciones de difusión limitada, de tal forma que la respuesta analítica (corriente faradaica, $I_{\text{faradaica}}$) sea proporcional a la concentración de ión libre e independiente de cualquier fenómeno que puede producirse en la disolución (como complejación, convección o adsorción).

La cuantificación del metal reducido se calcula a partir de la diferencia entre la corriente medida a un tiempo t_2 y la corriente de un blanco medida a este mismo tiempo. Por lo tanto, la función respuesta de AGNES será [Chito Trujillo, 2012]:

$$I_{\text{faradaica}} = I_{t_2} - I_{\text{blanco}} \quad (3.52)$$

La corriente medida está formada por:

- (a) La corriente capacitiva I_c , debida principalmente a la diferencia entre el potencial de deposición y el de reoxidación.
- (b) La corriente debida a la reducción del oxígeno I_{O_2} . El oxígeno estará presente en la muestra a nivel de trazas, a pesar de haber pasado flujo de N_2 por la celda.
- (c) La corriente faradaica debida al analito I_f .
- (d) La corriente faradaica debido a otras especies distintas del analito I_{fna} .

Así, la corriente total medida con AGNES a t_2 se puede expresar como:

$$I_{t_2} = I_c + I_{O_2} + I_f + I_{fna} \quad (3.53)$$

Por ello, la medida del blanco permite eliminar todos los componentes que no sean faradaicos de la corriente, así como los faradaicos debidos a las especies que no son el analito.

Para la medida de este blanco se puede utilizar el propuesto por Galceran y colaboradores, que se denomina *shifted blank* o blanco realizado a un potencial desplazado [Galceran y col., 2007]. Estudios anteriores utilizaban como blanco una disolución sintética preparada con la misma composición que la muestra, pero sin metal añadido. Este blanco presenta una serie de limitaciones: (a) la presencia de trazas de metal por contaminación no se evita fácilmente, y si la concentración de metal en el blanco no se determina correctamente, habrá una pérdida de exactitud en el método cuando se analicen muestras de bajas concentraciones de metal; (b) resulta muy difícil preparar muestras sintéticas cuyas matrices sean similares a las de las muestras naturales. Por ello, Galceran y col., propusieron un nuevo sistema para evaluar el blanco, que consiste en analizar la propia muestra utilizando el mismo programa de potencial que para las medidas reales, pero solamente con un pulso (AGNES 1P) y desplazando el potencial de deposición E_1 una cantidad ΔE_{shift} hacia valores menos negativos, en los que no se deposita el metal de interés, de forma que el valor de Y , y por tanto, de la corriente faradaica sea despreciable. En términos de ganancia, el valor del blanco shifted es insignificante al de la medida. Usualmente, el potencial de deposición para el shifted blank $E_{1, sb}$ corresponde con un factor de preconcentración ($Y_{1, sb}=0,01$) y el potencial de redisolución $E_{2, sb}$ se aplica de forma que se produzca el mismo salto de potencial que en la medida del metal en la muestra, que se realiza aplicando AGNES 2P [Rocha y col., 2010]. Así, la preconcentración $Y_{2, sb}$ se puede calcular como el producto del factor de preconcentración de deposición del blanco $Y_{1, sb}$ por el de stripping Y_2 entre el de deposición $Y_{1, b}$ de la medida principal, es decir: $Y_{2, sb} = Y_{1, sb} \cdot Y_2 / Y_{1, b}$ [Chito Trujillo, 2012].

En la Figura 3.10 se observa una gráfica de intensidad frente al tiempo, obtenida mediante la aplicación de AGNES para una muestra y su blanco.

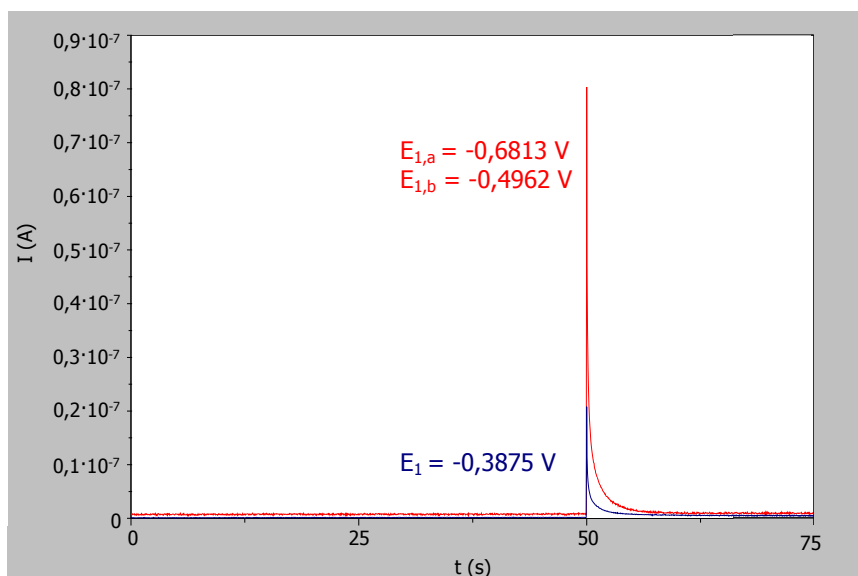


Figura 3.10. Valores de intensidad (señal analítica) frente al tiempo mediante la técnica AGNES 2P para una muestra de agua de mar sintética (línea roja) con una concentración de Pb(II) de $6 \cdot 10^{-7}$ mol/L y su correspondiente shifted blank (línea azul) realizado con AGNES 1P

El perfil de concentración que se alcanza en esta etapa de redisolución se muestra en la Figura 3.9.b.

En AGNES, puesto que la corriente faradaica no depende de las características de la disolución, no es necesario conocer los parámetros relacionados con la muestra, como concentración de ligando, constantes cinéticas o coeficientes de difusión del metal y del complejo.

Debido a la naturaleza lineal de la ecuación de continuidad del metal reducido dentro de la gota de mercurio y teniendo en cuenta la condición inicial de perfil plano y la condición de contorno, según la cual $c_{M^0} = 0$ en la interfase electrodo-disolución [Galceran y col., 2004], la intensidad medida es proporcional a la concentración de metal reducido al final de la primera etapa. Se establece entonces una relación, cuyo factor se denota por η , entre la intensidad faradaica y la concentración de metal reducido en la gota:

$$I_{\text{faradaica}} = \eta c_{M^0}^* \quad (3.54)$$

donde η solo depende del tiempo transcurrido en la etapa de redisolución y de las características del proceso de difusión de M^0 hacia el interior de la gota (tamaño y forma del electrodo y coeficiente de difusión) [Galceran y col., 2010].

Por otro lado, de la ecuación (3.50) se obtiene que la concentración de metal reducido es:

$$c_{M^0}^* = Yc_M^* \quad (3.55)$$

Sustituyendo esta ecuación en la ecuación (3.54), se encuentra que la intensidad medida en la etapa de redisolución y la concentración de metal libre quedan relacionadas a través de un factor de proporcionalidad h :

$$I_{\text{faradaica}} = \eta Yc_M^* = hc_M^* \quad (3.56)$$

donde h es un factor que depende de la geometría y tamaño del electrodo de mercurio, el tiempo de medida y la ganancia.

El factor h puede determinarse experimentalmente realizando una calibración por adición estándar, en la que se mide la corriente de una muestra con diferentes concentraciones de metal libre conocidas. De esta forma, si la calibración y la medida de la muestra problema se realizan con el mismo electrodo, mismo potencial aplicado y mismos tiempos característicos, bastará con conocer el valor de h para determinar la concentración libre de metal en cualquier muestra problema.

Alternativamente al uso estándar de la intensidad de corriente como función respuesta de AGNES, recientes trabajos [Galceran y col., 2010; Parat y col., 2011a] han propuesto utilizar la carga Q . Esta carga, que corresponde con la reoxidación total de M^0 , se obtiene integrando la ecuación (3.54) para el tiempo de la etapa de redisolución t_2 :

$$Q = \int_0^\infty I dt_2 = \int_0^\infty \eta c_{M^0}^* dt_2 = \left(\int_0^\infty \eta dt_2 \right) c_{M^0}^* = \eta_Q c_{M^0}^* \quad (3.57)$$

donde se utiliza el subíndice Q para indicar que la proporcionalidad se refiere a la carga, y no a la corriente. η_Q se relaciona con el volumen del electrodo. Si se asume un electrodo esférico de radio r_0 , se tiene que:

$$\eta_Q = 2F \frac{4}{3} \pi r_0^3 \quad (3.58)$$

Combinando las ecuaciones (3.55) y (3.57), se puede escribir:

$$Q = \eta_Q c_{M^0}^* = \eta_Q Yc_M^* = h_Q c_M^* \quad (3.59)$$

Si se ha determinado previamente h_Q en una calibración, las medidas de la carga Q en una muestra problema proporcionarán la concentración libre de metal:

$$c_M^* = \frac{Q}{h_Q} \quad (3.60)$$

También se ha estudiado otra variante de la técnica, que se denomina AGNES-SCP en la que se aplica una corriente de redisolución I_s y se mide el tiempo necesario para la reoxidación (τ). El producto $I_s\tau$ se corrige teniendo en cuenta la contribución de otros oxidantes presentes en la disolución, obteniendo la expresión $Q=(I_s-I_{ox})\tau$, que corresponde al valor de la carga faradaica [Parat, 2011b].

3.5. Material y metodología de análisis de Pb en agua de mar utilizando AGNES y SSCP

3.5.1. Disoluciones y equipos utilizados

El material utilizado para este capítulo fue el siguiente:

- El pH de todas las disoluciones fue medido con un pH-metro modelo Microprocessor (Hanna Instruments) equipado con un electrodo combinado de vidrio-Ag/AgCl XC 250, calibrado mediante patrones de pH 4 y 7.
- Las medidas de SSCP y AGNES se llevaron a cabo utilizando un potenciostato Eco Chemie Autolab PGSTAT12 conectado a un equipo de Metrohm 663 VA Stand y a un ordenador con el software GPES 4.9 (Eco Chemie) (Figura 3.11). Tanto en SSCP como en AGNES, se utilizó un electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE) como electrodo de trabajo, un electrodo de referencia Ag/AgCl saturado con NaNO_3 0,55 mol/L y un electrodo auxiliar de carbono vitrificado.

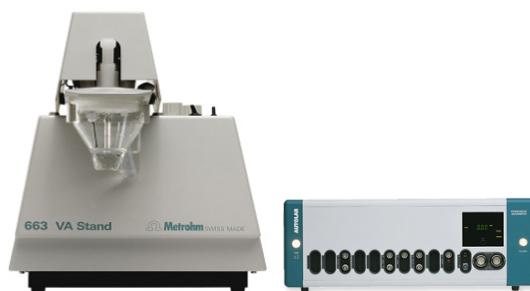


Figura 3.11. Equipo Metrohm 663 VA Stand con potenciostato Eco Chemie Autolab PGSTAT12

- El carbono orgánico de la muestra de agua de mar real se evaluó con el equipo analizador de carbono modelo 3100 (Analytik Jena, Alemania).

La preparación de las disoluciones utilizadas en este capítulo se encuentra detallada en el Anexo 1. Todas las disoluciones se prepararon en agua desionizada Milli Q. Las disoluciones de plomo se prepararon por dilución de una disolución estándar de 1000 mg/L de Pb (Merck, Alemania). Las disoluciones de NaNO_3 se prepararon a partir del sólido de calidad para análisis (Merck, Alemania). Las disoluciones reguladoras ácido 2-morfolino etano sulfónico (MES) 0,2 mol/L a pH 6 y ácido 3-morfolino propano sulfónico (MOPS) 0,2 ml/L a pH 7 fueron preparadas a partir del sólido (Fluka, Microselect, >99.5%). El ácido fúlvico fue cedido por Dr. Cooper Langford, de la Universidad de Calgary (Canadá). Las muestras de agua de mar sintéticas se prepararon disolviendo en agua Milli Q la sales presentes en agua de mar, en las concentraciones indicadas por Grasshoff y colaboradores [Grasshoff y col., 1982] (ver Tabla 2.26 en el Capítulo 2). Todas las sales utilizadas fueron de calidad para análisis (Merck, Alemania). Todo el material de laboratorio se limpió con HNO_3 (20% v/v) y enjuagado con agua Milli Q.

Previo al uso de las disoluciones de NaNO_3 y de agua de mar sintética, se evaluó sistemáticamente el nivel de contaminación que pudieran presentar estas disoluciones debido a la presencia de trazas de Pb(II) en el nitrato sódico y en las sales inorgánicas utilizadas para preparar las disoluciones. Esta determinación se realizó mediante voltamperometría de redisolución anódica de onda cuadrada (SW-ASV), ya que ofrece límites de detección muy bajos para metales pesados (del orden de 10^{-10} mol/L) [Chito Trujillo, 2012]. Se aplicó el método de calibración por adición estándar, utilizando un tamaño de gota de $2,5 \cdot 10^{-7}$ m². Los parámetros físicos, químicos y electroquímicos utilizados para llevar a cabo la técnica SW-ASV se detallan en la Tabla 3.4.

Se comprobó que los niveles totales de Pb(II) en las disoluciones preparadas de NaNO_3 (0,55 mol/L) y agua de mar sintética eran inferiores a $5,04 \cdot 10^{-9}$ y $6,70 \cdot 10^{-9}$ mol/L, respectivamente.

La temperatura del laboratorio se midió diariamente para todos los experimentos y fue de $23 \pm 0,8^\circ\text{C}$. Las variaciones en la temperatura fueron insignificantes, no influyendo así en los resultados.

Tabla 3.4. *Parámetros físicos, químicos y electroquímicos utilizados en la determinación de Pb(II) por SW-ASV*

Parámetro	Valor
Potencial de deposición	-1,3 V
Tiempo de deposición	30 s
Tiempo de equilibración	15 s
Potencial inicial de barrido	-1,3 V
Potencial final de barrido	-0,05 V
Salto de potencial	0,00495 V
Amplitud de pulso	0,01995 V
Velocidad de agitación	2500 min ⁻¹
Volumen de muestra	25 mL
Concentración de la disolución estándar de Pb(II)	10 ⁻⁴ mol/L
Rango de la calibración	Blanco-1,4·10 ⁻⁶ mol/L
Volúmen de la primera adición estándar	150 µL
Volúmen de la segunda y tercera adición estándar	100 µL

3.5.2. Metodología de análisis de Pb en agua de mar utilizando AGNES y SSCP

El objetivo de este trabajo es estudiar la aplicabilidad de las técnicas AGNES y SSCP al análisis de la especiación dinámica de Pb(II) en agua de mar. Al aplicar estas dos técnicas a una misma muestra, se obtendrá por un lado el valor de concentración de Pb(II) libre y, por el otro, las constantes de estabilidad de los posibles complejos formados. Además, se podrá estimar el carácter lábil de los complejos de plomo presentes en el sistema.

Para ello, se verificará la adecuación de ambas técnicas al estudio de este metal en aguas de mar sintética y real a diferentes valores de pH, abordando las dificultades que existen en estas matrices. Las muestras de agua de mar real se tomaron en la costa de Faro (Portugal), durante la estancia realizada en la Universidade do Algarve, y se almacenaron en botellas de PVC previamente lavadas con HNO₃ 2 mol/L (de calidad

Suprapur, Merck, Alemania) y agua Milli Q. Puesto que no presentaban gran cantidad de materia particulada, se analizaron sin filtrar con el objeto de no alterar los posibles equilibrios presentes en las mismas.

En la zona de Faro no se habían detectado en estudios previos concentraciones de plomo suficientemente altas para realizar un estudio de especiación ($\text{Pb(II)} \approx 10^{-9} \text{ mol/L}$) [Santos-Echeandía y col., 2012], por lo que en los estudios realizados en este capítulo se adicionó una alícuota de una disolución de plomo a las muestras de agua de mar real, de forma que la concentración de plomo total resultara del orden de $6 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$. La misma cantidad de plomo también fue adicionada a las muestras de agua de mar sintéticas.

Por ello, y dado que los niveles de Pb(II) presentes en dichas muestras, así como en las disoluciones de NaNO_3 y agua de mar sintética fueron previamente evaluadas, obteniéndose valores del orden de 10^{-9} mol/L , y puesto que las adiciones sucesivas de este metal para aplicar ambos métodos fueron de entre 100 y 1000 veces mayores, el contenido metálico total que se utilizó en los cálculos de especiación en la disolución fue igual a la concentración de Pb(II) añadido en cada una de las adiciones.

3.5.2.1. Metodología para el análisis del carbono orgánico

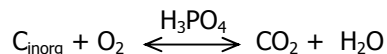
Debido a que la presencia de materia orgánica en las muestras de agua reales influye notablemente en el grado de complejación de los metales, antes de proceder a la aplicación de AGNES y SSCP a las muestras de agua de mar real, se evaluó el carbono orgánico total utilizando el equipo analizador de carbono Analytic Jena 3100. Este analizador utiliza el método diferencial, en el que el contenido de COT es obtenido por diferencia del contenido de carbono total y el contenido de carbono inorgánico en la muestra. El procedimiento seguido para analizar ambas concentraciones de carbono en las muestras fue el siguiente:

Análisis del contenido de carbono total

1. Se colocó la muestra en el automuestreador y de forma automática se inyectaron $500 \mu\text{L}$ en el horno vertical de cuarzo.
2. Al encontrarse el horno a una temperatura de 800°C el carbono procedente de la muestra, tanto orgánico como inorgánico, fue transformado en CO_2 y vapor de agua, catalizado por la presencia de platino.
3. El CO_2 producido fue transportado a través de un flujo continuo de gas O_2 a un detector de infrarrojo donde se determinó la concentración de carbono total a partir de un calibrado realizado con una mezcla de carbonato/bicarbonato.

Análisis del contenido de carbono inorgánico

1. Otra porción de 500 μL de muestra fue inyectada en una cámara de acidificación que contenía ácido ortofosfórico (H_3PO_4) al 10%, con control de temperatura a 10°C , en la que burbujeaba continuamente gas O_2 .
2. Al llegar a la cámara, el carbono inorgánico presente en la muestra sufrió la reacción siguiente:



3. El CO_2 producido en el paso anterior se determinó a través del mismo detector que el carbono total.

3.5.2.2. Experimentos de AGNES-SSCP

Cada experimento de AGNES y SSCP se llevó a cabo en la misma celda electroquímica (una técnica se aplicó seguida de la otra) durante el mismo día. Las experiencias de SSCP se realizaron en régimen de redisolución completa (I_τ constante).

A continuación se detalla la metodología seguida para el análisis de plomo en las muestras de agua de mar:

3.5.2.2.1. Metodología para AGNES

La técnica que se utilizó en esta tesis para determinar el metal libre fue AGNES 2P. La aplicación experimental de dicha técnica implica la siguiente secuencia de etapas:

1. Determinación del potencial de óxido-reducción del metal (E_{peak}) en las condiciones de trabajo mediante la técnica de polarografía de impulso diferencial (DPP). Con este parámetro se determinó el potencial de deposición E_1 que se aplicó posteriormente en AGNES.
2. Evaluación del parámetro h mediante calibración de una disolución de metal sin ligando.
3. Aplicación de AGNES a la muestra de estudio.

A continuación, se detallará cada una de las etapas:

(1) Determinación de E_{peak} a partir de una medida de DPP para obtener el potencial de deposición E_1

El potencial de deposición que se debe aplicar a la muestra viene definido por la ecuación (3.61), que resulta de la combinación de la ecuación (3.50) con la expresión para DPP en el caso de electrodo plano [Bard y Faulkner, 2001]. Así, se tiene que

$$Y = \sqrt{\frac{D_M}{D_{M^0}}} \exp \left[-\frac{nF}{RT} \left(E_1 - E_{peak} - \frac{\Delta E_{DPP}}{2} \right) \right] \quad (3.61)$$

donde D_M y D_{M^0} son los coeficientes de difusión del ión metálico libre y del metal reducido en la amalgama, y ΔE_{DPP} es la amplitud de pulso, parámetro característico de la técnica DPP.

Conociendo E_{peak} y la ganancia Y que se quiere alcanzar durante la etapa de preconcentración, se obtiene el valor de E_1 de deposición que se debe aplicar, teniendo en cuenta que para el plomo, los coeficientes de difusión son: $D_{Pb} = 9,85 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ y $D_{Pb^0} = 1,25 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$; y que el valor de n es igual a 2.

Así, previamente al procedimiento de AGNES, se debe llevar a cabo un experimento de polarografía de pulso diferencial (DPP) con el fin de determinar el potencial de óxido-reducción del metal E_{peak} de forma precisa para cada experimento, evitando así las posibles desviaciones en el electrodo de referencia.

Para ello, se colocaron en la celda del polarógrafo 25 mL de una disolución acuosa de NaNO_3 , con una fuerza iónica similar a la de agua de mar (0,55 mol/L). El pH de esta disolución fue próximo a 4 o ligeramente inferior, siendo adecuado para evitar la adsorción de metal sobre las paredes de la celda. La muestra fue purgada con N_2 para eliminar las posibles trazas de oxígeno que pudieran influir en la medida.

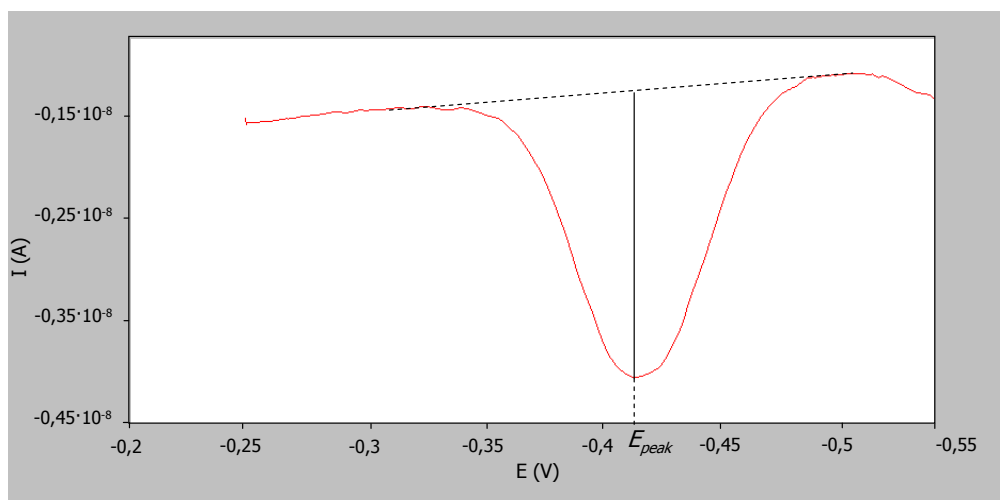
La DPP se realizó aplicando un barrido de potencial hacia valores más negativos, mediante pulsos. En cada pulso se aplicó un potencial más reductor y una amplitud de pulso ΔE constante. Se realizaron dos medidas de intensidad de corriente: la primera se efectuó 16,7 ms antes de aplicar el pulso, y la segunda 16,7 ms antes de acabar el pulso. La diferencia de intensidad por pulso se registró en función del potencial, el cual aumentó linealmente [Skoog y col., 2001].

Tras una primera adición de plomo a la disolución de NaNO_3 , se realizó un experimento DPP con el máximo tamaño de gota (área: $5,2 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2$), que por extrapolación permitió utilizar la expresión para el caso de electrodo plano (ecuación (3.61)). Los parámetros utilizados para llevar a cabo la DPP se describen en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. *Parámetros electroquímicos utilizados en las medidas de disoluciones de Pb(II) por DPP*

Parámetro	Valor
Tiempo de purga	1 h
Intervalo de tiempo para el salto de potencial	1 s
Tiempo de pulso	0,05 s
Potencial inicial de barrido	-0,25 V
Potencial final de barrido	-0,55 V
Salto de potencial	0,45 mV
Amplitud de pulso (ΔE)	49,95 mV
Velocidad de agitación	2500 min ⁻¹

En la Figura 3.12 se observa el polarograma obtenido cuando se aplicó DPP a una disolución acuosa de NaNO₃ con una primera adición de plomo de $6 \cdot 10^{-7}$ mol/L.

**Figura 3.12.** *Polarograma obtenido mediante la técnica DPP aplicada a una disolución acuosa de NaNO₃ 0,55 mol/L con una concentración de Pb(II) $6 \cdot 10^{-7}$ mol/L (parámetros electroquímicos: ver Tabla 3.5)*

(2) Evaluación del parámetro h mediante calibración de una disolución de metal sin ligando de fuerza iónica 0,55 mol/L

Después de la determinación del valor de E_{peak} de la disolución de Pb(II) se evaluó el parámetro h , a través del cual la intensidad de corriente se relacionaba directamente con la concentración de metal libre (ecuación (3.56)). Para ello se realizó una calibración a partir de una disolución de metal que no contenía ligando (NaNO_3 0,55 mol/L) y se fueron adicionando sucesivas concentraciones conocidas de Pb(II).

Así, una vez establecido el potencial del pico de plomo y conocida la concentración de dicho metal en la disolución, se aplicó la técnica AGNES en las sucesivas adiciones, obteniéndose los valores de intensidad (señal analítica) correspondientes.

El tamaño de gota en todos los experimentos de AGNES fue $2,5 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2$ y la velocidad de agitación, 2500 min^{-1} . Los parámetros electroquímicos utilizados en la aplicación de AGNES en la disolución de Pb(II) en NaNO_3 0,55 mol/L fueron establecidos a partir de estudios previos, y se detallan a continuación:

1. Primera etapa:

(a) Se aplicó un potencial $E_{1,a}$ bajo condiciones de difusión limitada, correspondiente a $Y_{1,a} = 10^8$ durante un tiempo $t_{1,a} = 35 \text{ s}$. Estos valores de ganancia Y y de tiempo fueron elegidos de manera que proporcionaran una señal de corriente en la muestra al menos 3 veces mayor que la corriente obtenida para el *shifted blank*.

(b) Se aplicó un potencial $E_{1,b}$ correspondiente al factor de preconcentración deseado, que se estableció en $Y_{1,b} = 50$ durante $t_{1,b} = 105 \text{ s}$ ($t_{1,b} = 3t_{1,a}$). El tiempo de espera sin agitación t_w fue de 50 s.

2. Segunda etapa:

El potencial aplicado E_2 correspondió con $Y_2 = 1 \cdot 10^{-8}$ bajo condiciones de reoxidación, durante 50 s. La corriente se midió para $t_2 = 0,16 \text{ s}$.

El blanco (*shifted blank*) se realizó con $Y_{1, sb} = 0,01$, que es despreciable comparado con la $Y_{1,b}$ que se utiliza en las medidas principales, de manera que el potencial de deposición calculado utilizando la ecuación (3.61) fue más positivo que en las medidas principales, y de esta forma, no se depositó nada de metal en la gota. La Y_2 para la etapa de reoxidación fue de $2 \cdot 10^{-12}$ (calculada como $Y_2 = Y_{1, sb} \cdot Y_2 / Y_{1,b}$). Así, la intensidad obtenida

para el blanco (I_{blanco}) se le restó a la corriente total medida a t_2 (I_{t_2}) con el fin de obtener la corriente faradaica ($I_{\text{faradaica}}$).

Puesto que la ecuación (3.56) relaciona la intensidad con la concentración de metal libre, se utilizó el programa de especiación en equilibrio Visual MINTEQ [Herndon y Flowery Branch, 1999; Gustafsson, 2010] para obtener dicha concentración a partir de la concentración total presente en cada punto de la calibración y de esta manera, calcular el valor de h . El programa MINTEQ (Figuras 3.13 y 3.14) es un programa de modelización científico capaz de simular la especiación de diferentes especies inorgánicas en equilibrio presentes en una muestra de agua, ya sea sintética o real. Así, mediante la introducción en el programa de las condiciones experimentales, como son el pH, temperatura, fuerza iónica, cantidad de carbono orgánico, componentes en la muestra y concentración total del analito, proporciona información de gran importancia, como son las diferentes especies químicas en las que el analito puede estar presente en la muestra, así como sus concentraciones.

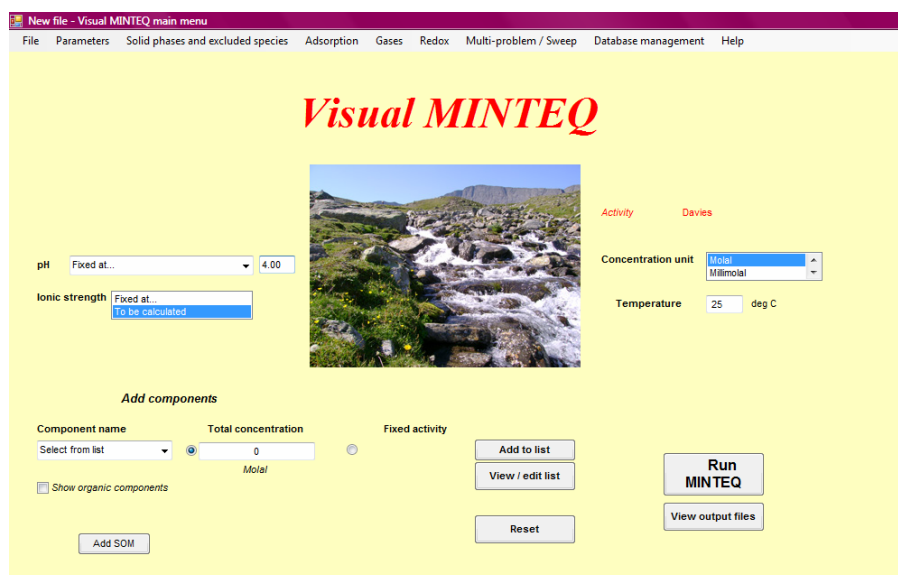


Figura 3.13. Ventana principal del programa Visual MINTEQ

Visual MINTEQ - Output			
File Options			
		No. of iterations	3
pH	4.000	Sum of cations (eq/kg)	5.1168E-01
Ionic strength	0.5500	Sum of anions (eq/kg)	5.1154E-01
		Charge difference (%)	0.013401
Concentrations and activities of aqueous inorganic species (mol / l)			Print to Excel
	Concentration	Activity	Log activity
H+1	1.3591E-04	1.0000E-04	-4.000
Na+1	5.1154E-01	3.7639E-01	-0.424
NaNO3 (aq)	3.5179E-02	3.9929E-02	-1.399
NaOH (aq)	4.2038E-11	4.7714E-11	-10.321
NO3-1	5.1154E-01	3.7639E-01	-0.424
OH-	1.3685E-10	1.0069E-10	-9.997
Pb(NO3)2 (aq)	1.3516E-07	1.5341E-07	-6.814
Pb(OH)2 (aq)	3.0589E-17	3.4719E-17	-16.459
Pb(OH)3-	4.7512E-24	3.4959E-24	-23.456
Pb+2	1.4707E-07	4.3108E-08	-7.365
Pb2OH+3	1.1783E-16	7.4495E-18	-17.128
Pb3(OH)4+2	3.5370E-30	1.0368E-30	-29.984
Pb4(OH)4+4	6.0543E-33	4.4694E-35	-34.350
PbNO3+	3.2617E-07	2.4000E-07	-6.620
PbOH+	1.4818E-11	1.0903E-11	-10.962
View species distribution Display saturation indices Equilibrated mass distribution			

Figura 3.14. Datos proporcionados por MINTEQ para las diferentes especies químicas de plomo y sus concentraciones en una disolución de Pb total $1,4 \cdot 10^{-6}$ mol/L de fuerza iónica 0,55 mol/L en NaNO₃ y pH 4, en ausencia de materia orgánica

(3) Aplicación de AGNES a muestras de agua de mar sintética y real

Después de la evaluación del parámetro h se limpió la celda adecuadamente con una disolución 2 mol/L de HNO₃ (calidad Suprapur) y posteriormente con agua Milli Q, y se procedió al estudio de la aplicabilidad de la técnica AGNES con muestras de agua de mar sintética y real.

El pH de las muestras se ajustó con ácido nítrico HNO₃ de calidad Suprapur, con la disolución reguladora de ácido 2-morfolino etano sulfónico (MES) 0,2 mol/L a pH 6 o con la de ácido 3-morfolino propano sulfónico (MOPS) 0,2 mol/L a pH 7. Se ha demostrado que ambas reguladoras tienen baja afinidad por el Pb(II) [Soares y col., 1999].

Una vez que la celda se limpió adecuadamente se comenzó el estudio colocando 25 mL de muestra de agua de mar en la celda (tanto en el caso de los estudios con agua sintética como en los de agua real). Se purgó la muestra con N_2 para eliminar las posibles interferencias del O_2 . Posteriormente, se ajustó la muestra a pH 2,7 haciendo uso de HNO_3 y se comenzó el análisis por AGNES, utilizando una gota de área $2,5 \cdot 10^{-7} m^2$. El programa de potencial aplicado fue el mismo que se utilizó para el análisis de la disolución de metal sin ligando, de fuerza iónica 0,55 mol/L.

Tras finalizar el programa, se registró la intensidad y se calculó la concentración de metal libre presente en la muestra mediante la aplicación de la ecuación (3.56), haciendo uso del valor de h previamente evaluado. Posteriormente, se fue modificando el pH a la misma muestra contenida en la celda, aplicando sucesivamente la técnica AGNES para diferentes valores de pH: 5; 6; 7 y 8,6 (en todos los casos se realizaron correcciones de concentración debido al volumen adicionado para ajustar el pH de las muestras). El programa de potencial aplicado para el caso de las muestras a pH 5 y 6 fue el mismo que se aplicó para el caso de la muestra a pH 2,7. Sin embargo, en el caso de las muestras a pH 7 y 8,6 fue necesario incrementar la sensibilidad del método aumentando el tiempo de aplicación del potencial de deposición, puesto que a valores básicos de pH la concentración de metal libre en la muestra es más baja.

Así, para estas últimas muestras, se eligió un valor de ganancia de $Y=100$, y se aplicó $E_{1,a}$ durante un tiempo $t_{1,a} = 70$ s, y $E_{1,b}$ durante $t_{1,b} = 210$ s. De esta forma, para calcular la concentración de metal libre que contenía la muestra, se tuvo que duplicar el valor de h evaluado anteriormente, de forma que la concentración de Pb(II) libre se calculó a partir de esta expresión:

$$C_M^* = \frac{I_{\text{faradaica}}}{2h} \quad (3.62)$$

Con el fin de validar las medidas de AGNES, las concentraciones de metal libre obtenidas en las muestras de agua de mar sintética y real se compararon con los valores teóricos predichos por el programa de especiación en equilibrio MINTEQ.

3.5.2.2.2. Metodología para SSCP

Las etapas en las que consiste la técnica SSCP se detallan a continuación:

(1) Calibración con SSCP de una disolución de metal sin ligando de fuerza iónica conocida

Para aplicar la técnica SSCP a las muestras de agua de mar reales, se requiere primero realizar una calibración en una disolución de $NaNO_3$ de fuerza iónica similar, mediante la

cual se obtienen los valores de τ^* y del potencial de semi-onda del metal en una disolución en ausencia de ligando $E_{1/2,M}$.

Previamente se estudió la influencia de la fuerza iónica de la disolución metálica en las curvas SSCP y, por tanto, en los parámetros τ^* y $E_{1/2,M}$. Para ello, se aplicó SSCP a 3 disoluciones de Pb(II) $1,4 \cdot 10^{-6}$ mol/L en NaNO₃ de concentraciones 0,01, 0,1 y 0,55 mol/L, todas ellas a un pH menor que 4 para evitar que el metal se complejara y obtener los parámetros característicos para una disolución de metal sin ligando.

Así pues, se aplicó la técnica SCP con los parámetros electroquímicos siguientes: el tiempo de purga inicial fue de 1 hora, la velocidad de agitación fue 2500 min⁻¹, el potencial de deposición se mantuvo constante durante 45 s (tiempo suficiente para que se depositara el metal) en un valor E_d tras el cual se aplicó una corriente oxidante de redisolución $I_s = 2,5 \cdot 10^{-9}$ A, que proporcionaba, según estudios previos, condiciones de redisolución completa, dado que se conseguía que el producto $I_s \tau$ se mantuviese constante. Las curvas SSCP se construyeron a partir de las medidas individuales de SCP, representando los datos de τ (área bajo el pico) obtenidos para cada potencial de deposición E_d , que se varió desde -0,4 V hasta -0,57 V.

En la Figura 3.15 se ha representado un ejemplo de las curvas SCP superpuestas correspondientes a cada uno de los potenciales de deposición aplicados. Las curvas más altas corresponden a valores de potencial más negativos. Se puede observar claramente que para potenciales de deposición suficientemente negativos, el área bajo la curva, es decir τ , fue llegando a su valor límite τ^* , a partir del cual se mantuvo constante.

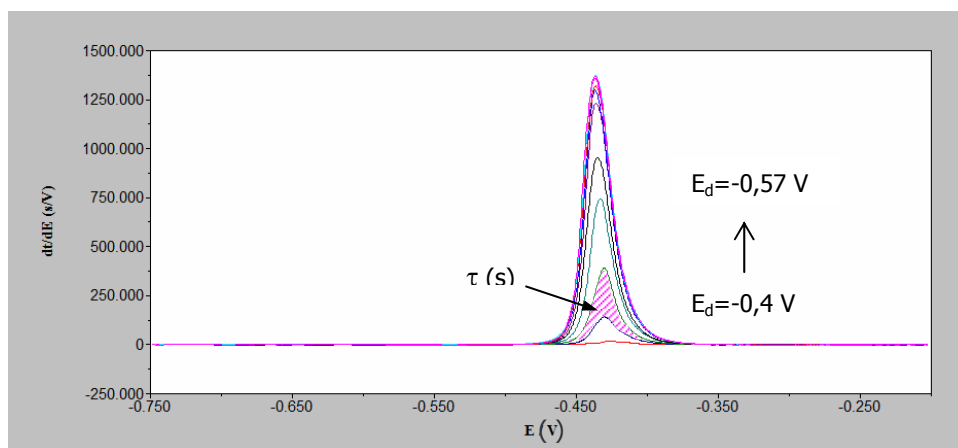


Figura 3.15. Ejemplo de curvas SCP para una disolución de Pb(II) $1,4 \cdot 10^{-6}$ mol/L en NaNO₃ 0,55 mol/L a pH 3,76 para diferentes potenciales de deposición (desde -0,4 V hasta -0,57 V)

Los valores de τ obtenidos de las curvas SCP fueron representados frente al valor de potencial de deposición E_d aplicado en cada caso. Así, se obtuvieron las curvas SSCP para cada disolución acuosa de Pb(II) $1,4 \cdot 10^{-6}$ mol/L de diferente fuerza iónica y pH < 4 (Figura 3.16).

El valor τ^* (Figura 3.16) o tiempo de transición límite se obtuvo calculando la media de los valores más altos y constantes de τ .

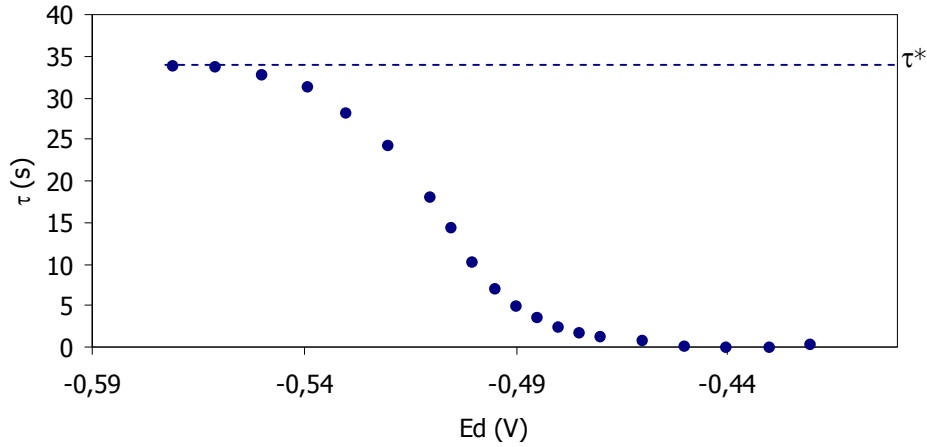


Figura 3.16. Ejemplo de curva SSCP para la disolución de Pb(II) $1,4 \cdot 10^{-6}$ mol/L en NaNO_3 0,55 mol/L construida a partir de los valores de τ (s) de las curvas SCP de la Figura 3.15

Una vez obtenidos los puntos experimentales, se pasó a construir la curva teórica SSCP. Para ello, se diseñó una hoja Excel con los siguientes parámetros: E_d (eje x de la curva SSCP), θ , τ_d , τ (eje y de la curva SSCP), valor promedio del potencial de deposición E_d entre un punto y el siguiente, y el incremento del eje y con respecto al incremento del eje x ($\Delta y / \Delta x$). Cada uno de estos parámetros se calculó haciendo uso de las ecuaciones (3.11), (3.12), (3.17), (3.19) y (3.20). Así, el orden a seguir en los cálculos fue el siguiente:

1. Con los datos obtenidos experimentalmente de τ^* , y con la corriente de redisolución aplicada I_s y el tiempo de deposición t_d establecido, se calculó la corriente límite de deposición con la siguiente ecuación:

$$\tau^* = \frac{I_d^* t_d}{I_s} \longrightarrow I_d^* = \frac{\tau^* I_s}{t_d} \quad (3.20)$$

2. Conociendo la corriente límite de deposición, el coeficiente de difusión del ión Pb(II) ($9,85 \cdot 10^{-10}$ m²/s), el radio ($1,4 \cdot 10^{-4}$ m) y el área de la gota ($2,5 \cdot 10^{-7}$ m²), la

concentración total y las constantes n (2) y F (96485 C/mol), se calculó δ_M a partir de la ecuación (3.11). Con la ecuación (3.10) se puede calcular el factor γ para futuros análisis si las condiciones hidrodinámicas se mantienen invariables.

$$I_d^* = nFAD_M c_M^* \left(\frac{1}{\delta_M} + \frac{1}{r_o} \right) \quad (3.11)$$

$$\delta_M = \gamma D_M^{1/3} \quad (3.10)$$

3. Se fue dando valores al parámetro E_d , en incrementos de 0,5 mV (para obtener una curva teórica muy bien definida), y para cada uno de ellos se calculó θ con la siguiente ecuación:

$$\theta = \frac{c_M^0}{c_{M^0}^0} = \exp \left(\frac{nF}{RT} (E_d - E^0) \right) \quad (3.12)$$

donde R era 8,31 J/mol K y T era 296,15 K. Como primera aproximación, se eligió un valor inicial de E^0 que correspondió con el E_{peak} de la DPP que se había realizado anteriormente como paso previo a la aplicación de AGNES.

4. Conocido el valor de θ y el volumen de la gota ($1,18 \cdot 10^{-11} \text{ m}^3$), se halló el valor de τ_d :

$$\tau_d = \frac{V}{AD_M \theta} \left(\frac{1}{\delta_M} + \frac{1}{r_o} \right)^{-1} \quad (3.17)$$

5. Y con el valor de τ_d se obtuvo el valor de τ , según la siguiente expresión:

$$\tau = \frac{I_d^* \tau_d}{I_s} [1 - \exp(-t_d / \tau_d)] \quad (3.19)$$

De esta manera, a cada valor de E_d le correspondió un valor de τ . Representando estos valores (E_d en el eje x y τ en el eje y) se construyó la curva teórica SSCP para un valor inicial aproximado de E^0 . La curva teórica SSCP así construida no coincidía perfectamente con los puntos experimentales, por lo que se fue modificando el valor de E^0 hasta que visualmente las curvas teórica y experimental estuvieran ajustadas. La representación gráfica de la curva teórica de τ frente a E_d permitió observar la bondad del ajuste por comparación de la curva con la posición de los puntos experimentales (ver Figura 3.5).

Una vez ajustada la curva teórica SSCP, se procedió a calcular el valor del potencial de semi-onda del metal en disolución en ausencia de ligando. Para ello, se fue calculando el

promedio de dos valores sucesivos de E_d , así como el incremento de τ con respecto al incremento de E_d de la siguiente manera:

$$\overline{E_d} = \frac{E_{d,1} + E_{d,2}}{2}; \quad \frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{\tau_2 - \tau_1}{E_{d,2} - E_{d,1}}$$

Para cada valor de τ y E_d , se obtuvo un valor de $\overline{E_d}$ y de $\Delta y/\Delta x$. Se halló entonces, el valor máximo de $\Delta y/\Delta x$, al cual le correspondió un valor de $\overline{E_d}$ (que fue el valor de x en el cual aparece el punto de inflexión de la curva SSCP) y que equivalía al valor de potencial de semi-onda.

En la Tabla 3.6 puede observarse parte de la hoja Excel diseñada para la construcción de la curva teórica SSCP en el caso de la disolución de plomo en NaNO_3 0,55 mol/L.

Tabla 3.6. Hoja Excel diseñada para obtener la curva teórica SSCP para una disolución de plomo ($1,4 \cdot 10^{-6} \text{M}$) en NaNO_3 0,55 mol/L

Eje x: E_d (V)	θ	τ_d (s)	Eje y: τ (s)	$\overline{E_d}$ (V)	$\Delta y/\Delta x$ (s/V)
-0,57	0,00051	3315,59	33,94		
-0,5695	0,00053	3189,01	33,93	-0,56975	-18,24
-0,569	0,00055	3067,27	33,92	-0,56925	-18,96
-0,5685	0,00057	2950,17	33,91	-0,56875	-19,70
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
-0,5075	0,06557	25,56	16,07	-0,50775	-793,34
-0,507	0,06817	24,58	15,67	-0,50725	-793,79
-0,5065	0,07088	23,64	15,28	-0,50675	-793,28
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
-0,4015	251,43292	$6,66 \cdot 10^{-3}$	$5,06 \cdot 10^{-3}$	-0,40175	-0,402
-0,401	261,41260	$6,41 \cdot 10^{-3}$	$4,87 \cdot 10^{-3}$	-0,40125	-0,386
-0,4005	271,78839	$6,17 \cdot 10^{-3}$	$4,68 \cdot 10^{-3}$	-0,40075	-0,372
-0,4	282,57600	$5,93 \cdot 10^{-3}$	$4,50 \cdot 10^{-3}$	-0,40025	-0,357

En este ejemplo, el valor máximo absoluto de $\Delta y/\Delta x$ fue 793,79 s/V, al cual le correspondió un valor de potencial de semi-onda del metal en disolución sin ligandos de $E_{1/2,M} = -0,507 \text{ V}$.

De esta manera se construyeron las curvas SSCP para cada una de las disoluciones de plomo en NaNO_3 con diferentes valores de fuerza iónica, que están representadas en la Figura 3.17.

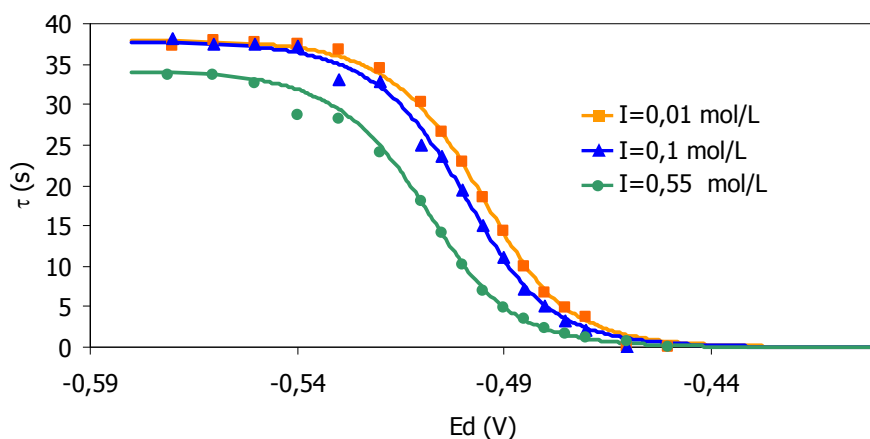


Figura 3.17. Efecto de la fuerza iónica en la curva SSCP de una disolución de Pb(II) ($1,4 \cdot 10^{-6}$ mol/L) con una matriz de NaNO_3 de diferentes concentraciones

En la mayoría de los estudios realizados hasta el momento (ver Tabla 3.3) se había trabajado con una fuerza iónica de 0,01 o 0,1 mol/L (bien utilizando NaNO_3 o KNO_3), ya que la técnica SSCP no había sido aplicada a agua de mar. En este trabajo, puesto que se trabajó con muestras cuya fuerza iónica era aproximadamente 0,55 mol/L, debió tenerse en cuenta el efecto de la presencia de esta elevada salinidad durante el calibrado inicial. En disoluciones de NaNO_3 con fuerza iónica baja, casi todo el metal se encuentra en su forma libre. Sin embargo, si aumenta esa fuerza iónica, el plomo comenzará a formar diversos compuestos y/o complejos inorgánicos, por lo que la curva SSCP se verá desplazada hacia la izquierda. Esto fue comprobado en esta Tesis cuando se analizaron por SSCP tres disoluciones de NaNO_3 con concentraciones diferentes (0,01, 0,1 y 0,55 mol/L). Así, en la Figura 3.17 puede observarse que cuando la fuerza iónica es de 0,55 mol/L, la curva se desplaza a la izquierda, indicando la disminución del metal libre por formación de compuestos de diversa naturaleza. Esto se tuvo en cuenta para calcular la constante de estabilidad condicional K' a partir de la diferencia de potencial de semi-onda del metal sin ligandos y del metal complejoado $\Delta E_{d,1/2}$ utilizando la ecuación (3.32)). Además, se añadió otra corrección al potencial de semi-onda del metal en NaNO_3 0,55 mol/L; esta corrección se basa en que el SSCP trabaja sobre actividades, en lugar de concentraciones. Con la ayuda de MINTEQA, que utiliza actividades, se calculó la concentración de metal libre en el caso de la muestra de plomo de concentración total $1,4 \cdot 10^{-6}$ mol/L en NaNO_3 0,55 mol/L, a

un pH de 3,44. Con esa concentración libre, se calculó la constante de formación del complejo K' , haciendo uso de la siguiente expresión:

$$K' = \frac{c_{M,T} - c_M}{c_M} \cdot f \quad (3.63)$$

donde f es el coeficiente de actividad, que se calcula como

$$f = 10^{-0,512 \frac{\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}}} \quad (3.64)$$

siendo I la fuerza iónica.

Este valor de K' , calculado a partir de datos proporcionados por MINTEQ, tiene en cuenta tanto la influencia de la fuerza iónica como la del coeficiente de actividad. Así, a partir de esta K' se puede calcular un factor de corrección haciendo uso de la ecuación (3.32), donde el segundo logaritmo es cero puesto que no se comparan dos disoluciones diferentes, sino la misma pero realizando la corrección al aplicar el coeficiente de actividad:

$$\Delta E = -\frac{RT}{nF} [\ln(1 + K')] \quad (3.65)$$

Así, se calculó el coeficiente de actividad f , para una I de 0,55 mol/L, dando un resultado de 0,605. A partir de f y de los datos de $c_{M,T}$ ($1,4 \cdot 10^{-6}$ mol/L) y c_M proporcionado por MINTEQ ($3,4 \cdot 10^{-7}$ M), se calculó el valor de K' , que resultó ser 1,89. De esta manera, se halló el valor de ΔE , que fue $-1,36 \cdot 10^{-2}$ V. Este valor fue el factor de corrección debido a la elevada salinidad, utilizado en todas las muestras de estudio para calcular la diferencia de potenciales de semi-onda $\Delta E_{d,1/2}$ (y así obtener el valor de K' del sistema estudiado a partir de la ecuación (3.32)), con la siguiente expresión:

$$\Delta E_{d,1/2} = E_{1/2,M+L} - (E_{1/2,M} - \Delta E) \quad (3.66)$$

Una vez estudiada la influencia de la fuerza iónica en las curvas SSCP, se pasó a aplicar esta técnica a la misma disolución de NaNO_3 0,55 mol/L a $\text{pH} < 4$ empleada en la determinación del parámetro h en la calibración con AGNES. Antes de aplicar SSCP a esta muestra, se purgó durante un periodo corto de tiempo, de alrededor de 5 minutos, puesto que ya había sido previamente purgada antes de la aplicación de AGNES. Esta disolución de 25 mL contenía del orden de $1,4 \cdot 10^{-6}$ mol/L de Pb(II) después de las 3 adiciones estándar que se realizaron. El volumen final de la disolución era de 25,35 mL. Así se obtuvo el valor de τ_M^* y $E_{1/2,M}$ para el sistema de metal sin ligando. Puesto que las muestras de estudio de agua de mar sintética y agua de mar real no contenían la misma cantidad de metal, los valores que se obtendrían de τ_M^* y τ_{M+L}^* no serían comparables. Por ello, una vez obtenido el valor de τ_M^* se dividió entre la concentración de plomo en la disolución de NaNO_3 , de

manera que se obtuvo el valor de τ_M^* por unidad de concentración total de plomo sin complejar. De esta forma, este nuevo factor se multiplicó por la concentración de la muestra de estudio que se analizaría posteriormente, de manera que se obtuvo un τ_M^* *corregido*

$$\tau_{M, \text{ corregido}}^* = C_{M,T} \text{ (en la muestra de estudio)} \cdot \frac{\tau_M^*}{C_{M,T} \text{ (en la disolución de calibración)}} \quad (3.68)$$

que fue el que se utilizó en la ecuación (3.32) en el cálculo del valor de la constante K' para evitar el efecto producido por la diferencia de concentraciones entre la disolución con la que se realizó la calibración inicial y la concentración de la muestra de estudio.

(2) Aplicación de SSCP a muestras de agua de mar

Conocido el valor de τ_M^* , se limpió la celda y se colocaron 25 mL de la muestra de agua de mar, que era la misma a la cual se le había aplicado anteriormente la técnica AGNES, con una concentración total de plomo de $6 \cdot 10^{-7}$ mol/L. Se ajustó el pH bien con HNO_3 , o con las disoluciones reguladoras MES y MOPS. Así, tras aplicar la técnica AGNES, se procedió a la aplicación de la SSCP para cada valor de pH. Para ello, se aplicó la técnica SCP con los mismos parámetros electroquímicos que se utilizaron en el caso de la calibración de la disolución acuosa de plomo en NaNO_3 0,55 mol/L. Las curvas SSCP se construyeron a partir de las medidas individuales de SCP, representando los datos de τ (área bajo el pico) obtenidos para cada potencial de deposición E_d , que se varió desde -0,4 V hasta -0,57 V o incluso valores más negativos en el caso de las muestras a pH 7 y 8, por el posible desplazamiento hacia la izquierda que pudiera presentar la curva a estos valores de pH.

Una vez obtenidos los puntos experimentales y calculado el valor de τ_{M+L}^* , se procedió a construir la curva teórica de la siguiente manera:

Al igual que en el caso de la disolución de plomo en NaNO_3 , se diseñó una hoja Excel con los siguientes parámetros: E_d (eje x de la curva SSCP), θ , τ_d , τ (eje y de la curva SSCP), valor promedio del potencial de deposición E_d entre un punto y el siguiente, y el incremento del eje y con respecto al incremento del eje x ($\Delta y / \Delta x$). Cada uno de estos parámetros se calculó haciendo uso de las ecuaciones (3.12), (3.19), (3.37), (3.45) y (3.46), como se verá a continuación. Así, el orden a seguir en los cálculos fue el siguiente:

1. Se fue dando valores al parámetro E_d , en incrementos de 0,5 mV (para obtener una curva teórica muy bien definida), y para cada uno de ellos se calculó θ con la siguiente ecuación:

$$\theta = \exp\left(\frac{nF}{RT}(E_d - E^0)\right) \quad (3.12)$$

Como primera aproximación, se eligió un valor inicial de E^0 que correspondió con el E^0 obtenido en la calibración de la disolución de plomo en NaNO_3 0,55 mol/L, tras ajustar la curva teórica a los puntos experimentales.

2. Con el parámetro γ calculado a partir de la calibración de la disolución de plomo en NaNO_3 0,55 mol/L, se halló el valor de $\bar{\delta}$ a partir de la siguiente ecuación:

$$\bar{\delta} = \gamma \bar{D}^{-1/3} \quad (3.37)$$

Puesto que en agua de mar existen una gran variedad de ligandos, el coeficiente de difusión de los complejos no se conoce. Por ello, se realizó una primera aproximación que consistió en suponer que $D_M \approx D_{ML} \approx \bar{D}$, es decir, que los ligandos presentes en la muestra son pequeños.

3. Con el valor de $\bar{\delta}$ y conociendo el radio de la gota ($1,41 \cdot 10^{-4}$ m) se calculó el valor de \bar{d} , como $\bar{d} = (1/\bar{\delta} + 1/r_0)^{-1}$
4. Conocido θ , \bar{d} , \bar{D} , el área de la gota ($2,5 \cdot 10^{-7}$ m²) y el volumen de la gota ($1,18 \cdot 10^{-11}$ m³), se halló el valor de τ_d :

$$\tau_d = \frac{V}{A\theta} \left(\frac{\bar{d} - \mu}{\bar{D}(1 + K')} + \frac{\mu}{D_M} \right) \quad (3.46)$$

Para este cálculo se realizó una segunda aproximación, que fue suponer que el sistema era lábil, por lo que se eligió un valor de μ muy pequeño (10^{-9} m), de forma que fuera despreciable y no influyera en el cálculo. Además, se eligió un valor aleatorio inicial de K' de 1.

5. Utilizando el valor de concentración de plomo libre en la disolución c_M^* que ofrece MINTEQ, se calculó el valor de $I_{d,M+L}^*$:

$$I_{d,M+L}^* = nFAC_M^* \left(\frac{\bar{d} - \mu}{\bar{D}(1 + K')} + \frac{\mu}{D_M} \right)^{-1} \quad (3.45)$$

6. Y con el valor de $I_{d,M+L}^*$, τ_d , I_s y t_d se obtuvo el valor de τ , según

$$\tau = \frac{I_d^* \tau_d}{I_s} [1 - \exp(-t_d / \tau_d)] \quad (3.19)$$

De esta manera, a cada valor de E_d le correspondió un valor de τ . Representando estos valores (E_d en el eje x y τ en el eje y) se construyó la curva teórica SSCP para el valor

inicial aproximado de E^0 elegido. La curva teórica SSCP así construida no coincidía perfectamente con los puntos experimentales, por lo que se fue modificando el valor de E^0 hasta que visualmente las curvas teórica y experimental se ajustaran. El parámetro E^0 se usó para modificar la curva a lo largo del eje x . Además, en este caso también hubo que modificar la curva a lo largo del eje y para que quedara a la misma altura que la experimental. Para ello se fue variando el valor de K' de las ecuaciones (3.45) y (3.46) hasta que se igualaran los valores de τ_{M+L}^* experimental y el teórico, calculado como $\tau_{M+L,teórico}^* = I_{d,M+L}^* t_d / I_s$.

De este modo, se obtuvieron los valores de E^0 y de K' .

Una vez que la curva teórica coincidía perfectamente con los datos experimentales, se procedió al cálculo de $E_{1/2,M+L}$ como punto de inflexión de la curva. Para ello, se siguió el mismo procedimiento que el utilizado en el caso de la disolución de plomo en NaNO_3 . Así, con este valor de $E_{1/2,M+L}$ y con el valor de $E_{1/2,M}$ obtenido en la calibración de la disolución de plomo en NaNO_3 0,55 mol/L, se calculó el valor de $\Delta E_{d,1/2}$, según la ecuación:

$$\Delta E_{d,1/2} = E_{1/2,M+L} - (E_{1/2,M} - \Delta E) \quad (3.66)$$

Haciendo uso de la ecuación:

$$\Delta E_{d,1/2} = -\frac{RT}{nF} \left[\ln(1 + K') + \ln(\tau_{M+L}^* / \tau_M^*) \right] \quad (3.32)$$

y teniendo en cuenta que τ_M^* se debe sustituir por τ_M^* *corregido*, según la ecuación (3.68), se halló el valor de K' a partir de $\Delta E_{d,1/2}$. Este valor de K' se comparó con el obtenido durante el ajuste de la curva teórica. Si entre las dos constantes no hubiera diferencia alguna, el sistema se consideraría lábil. Si existiera diferencia, significaría que las condiciones que se asumieron al principio no se cumplieron; es decir, que el sistema podría ser no lábil, o lábil con complejos cuyos coeficientes de difusión fueran mucho menores que el del metal en ausencia de ligando. Estos dos casos se podrían diferenciar fijándose en la forma de las curvas. Si las curvas del sistema de metal con ligando tienen la misma o similar altura a la del sistema sin ligando, significará que el sistema es lábil y entonces, los complejos tendrían un menor coeficiente de difusión que el del metal solo. En caso contrario, si existe una gran diferencia entre las curvas, significará que el sistema es no lábil. En estos casos, el cálculo de K' a partir de las ecuaciones (3.45) y (3.46)) no sería fiable para caracterizar el sistema.

3.6. Resultados del análisis de especiación de Pb en agua de mar sintética y real

3.6.1. AGNES

3.6.1.1. Determinación de E_{peak} a partir de medidas de DPP para obtener el potencial de deposición E_1 que se aplicará en AGNES

El valor de E_{peak} fue evaluado previamente a la aplicación de AGNES cada día. Para ello se realizaron medidas de DPP en una disolución de NaNO_3 de fuerza iónica 0,55 mol/L, de pH 3,44 y con una concentración de Pb(II) adicionado de $6 \cdot 10^{-7}$ mol/L. Cada vez que se estudió una muestra de agua de mar, tanto sintética como real, se evaluó este parámetro en una disolución de NaNO_3 . Así, como las muestras de agua de mar sintética y real fueron analizadas por triplicado, se obtuvieron diversos valores de E_{peak} de los análisis diarios, el cual varió entre -0,4161 y -0,4390 V. Puesto que el valor de E_{peak} fue evaluado en una matriz salina de fuerza iónica similar a la de las muestras de estudio (0,55 mol/L), fue posible utilizarlo en el análisis dichas muestras.

En la Figura 3.18 se observa el registro de DPP en el cual se muestra un ejemplo de la variabilidad en el parámetro E_{peak} .

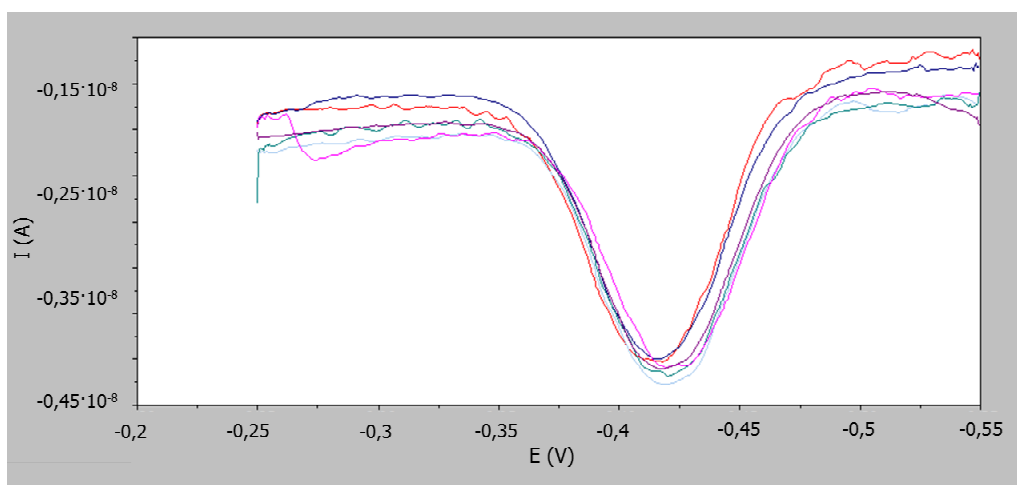


Figura 3.18. Registro DPP de las disoluciones de Pb(II) $6 \cdot 10^{-7}$ mol/L en NaNO_3 0,55 mol/L

3.6.1.2. Evaluación del parámetro h mediante calibración de una disolución de metal sin ligando

Para evaluar el parámetro h se realizó la calibración de una disolución de metal de fuerza iónica 0,55 mol/L de NaNO_3 a pH 3,44. Para ello, se fue añadiendo volúmenes conocidos de una disolución patrón de Pb(II), de manera que el rango de calibración fue $3 \cdot 10^{-9}$ - $1,4 \cdot 10^{-6}$ mol/L. Para cada una de las adiciones, se realizó por duplicado una medida de AGNES, con la que se obtuvieron valores de intensidad de corriente. De esta manera, se representó la corriente obtenida para cada una de las disoluciones frente a la concentración libre de metal teórico que proporciona el programa MINTEQ a partir de las concentraciones totales de metal, y se obtuvo la pendiente de la recta h. Este parámetro fue evaluado cada día que se analizó una muestra de estudio, por lo que se obtuvieron valores de h comprendidos entre 0,340 y $0,389 \text{ A} \cdot (\text{mol/L})^{-1}$. En la Tabla 3.7 se pueden observar los compuestos mayoritarios de Pb(II) predichos por MINTEQ que pueden formarse en la disolución de NaNO_3 0,55 mol/L a pH 3,44 y 23 °C de temperatura, para cada una de las adiciones.

Tabla 3.7. Compuestos mayoritarios de Pb(II) predichos por MINTEQ presentes en una disolución de NaNO_3 0,55 mol/L (pH 3,44) a 23 °C

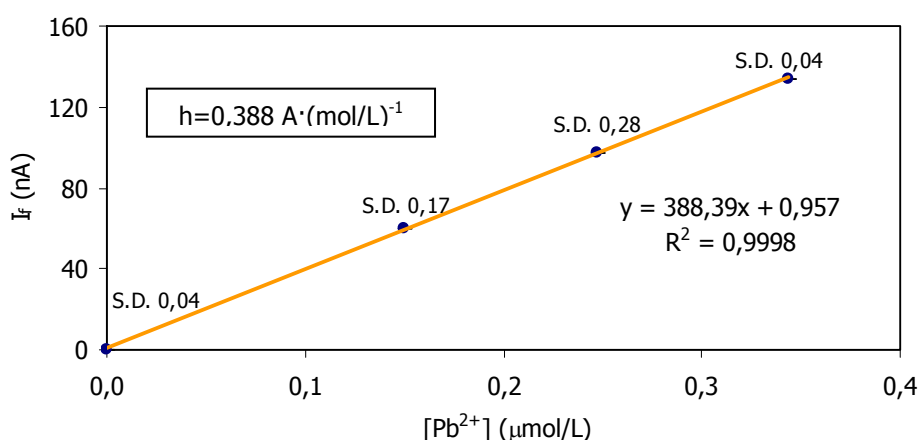
[Pb(II)] _{total} (mol/L)	Compuestos principales de Pb(II) (mol/L (% sobre el total))		
	Pb^{2+}	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (aq)	PbNO_3^+
$3,05 \cdot 10^{-9}$	$7,70 \cdot 10^{-10}$ (25,2%)	$6,72 \cdot 10^{-10}$ (22,0%)	$1,61 \cdot 10^{-9}$ (52,8%)
$6,22 \cdot 10^{-7}$	$1,50 \cdot 10^{-7}$ (24,1%)	$1,40 \cdot 10^{-7}$ (22,5%)	$3,32 \cdot 10^{-7}$ (53,4%)
$1,02 \cdot 10^{-6}$	$2,47 \cdot 10^{-7}$ (24,2%)	$2,29 \cdot 10^{-7}$ (22,4%)	$5,44 \cdot 10^{-7}$ (53,4%)
$1,41 \cdot 10^{-6}$	$3,43 \cdot 10^{-7}$ (24,3%)	$3,15 \cdot 10^{-7}$ (22,3%)	$7,52 \cdot 10^{-7}$ (53,3%)

Así, se puede observar que los compuestos mayoritarios en la disolución de NaNO_3 son PbNO_3^+ (en un 53% de la concentración total de Pb(II)), seguido de Pb^{2+} libre (en un 24-25%) y finalmente $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ (en un 22-22,5%).

En la Tabla 3.8 se observan los valores de concentración total y de concentración de Pb(II) libre predicho por MINTEQ para la disolución de NaNO_3 0,55 mol/L en cada una de las adiciones, así como los valores de intensidad obtenidos al aplicar AGNES. Además, en la Figura 3.19 se muestra una curva típica de calibrado en AGNES donde se observa la relación lineal existente entre la corriente faradaica y la concentración de metal libre en la disolución.

Tabla 3.8. Variables del análisis por AGNES de una disolución de NaNO_3 0,55 mol/L (pH 3,44) tras sucesivas adiciones de Pb(II)

$[\text{Pb(II)}]_{\text{total}}$ (mol/L)	$[\text{Pb(II)}]_{\text{libre}}$ (MINTEQ) (mol/L)	I_{Total} (AGNES) (nA)	$I_{\text{shifted blank}}$ (AGNES) (nA)	I_f (AGNES) (nA)
$3,05 \cdot 10^{-9}$	$7,70 \cdot 10^{-10}$	4,7	4,4	0,3
$6,22 \cdot 10^{-7}$	$1,50 \cdot 10^{-7}$	64,4	4,5	59,9
$1,02 \cdot 10^{-6}$	$2,47 \cdot 10^{-7}$	102,0	4,3	97,7
$1,41 \cdot 10^{-6}$	$3,43 \cdot 10^{-7}$	138,0	4,3	133,7

**Figura 3.19.** Curva de calibración para Pb(II) en NaNO_3 0,55 mol/L a pH 3,44.
Parámetros: $t_{1,a} = 35$ s, $t_{1,b} = 105$ s, $Y_{1,a} = 10^8$, $Y_{1,b} = 50$, $Y_2 = 10^{-8}$ ($n=2$)

3.6.1.3. Aplicación de AGNES a las muestras de estudio

Antes de la aplicación de AGNES a agua de mar, se procedió a evaluar el límite de detección de la técnica. Para ello, se prepararon 7 muestras de agua de mar sintética, sin ninguna concentración añadida de plomo, conteniendo las sales inorgánicas que están presentes en agua de mar [Grasshoff y col., 1983]. Las muestras así preparadas fueron colocadas en la celda de medida, se aplicó el programa de potencial de AGNES 2P anteriormente mencionado y se cuantificaron los niveles de intensidad de cada una. Se realizaron por cada muestra (blanco) dos análisis de AGNES, uno para $Y=50$ y otro para $Y=100$, para determinar el límite de detección correspondiente en ambas condiciones.

Los valores de intensidad obtenidos para cada una de las muestras blanco y para cada valor del factor de preconcentración se detallan en la Tabla 3.9. Como puede observarse, en general se consiguen valores más altos de intensidad cuando la Y es mayor.

Tabla 3.9. Intensidad (señal analítica) obtenida tras la aplicación de la técnica AGNES en muestras de agua de mar sintética sin adición de metal

Blanco	Intensidad (A)	
	Y=50	Y=100
1	$3,3 \cdot 10^{-10}$	$2,7 \cdot 10^{-9}$
2	$2,9 \cdot 10^{-10}$	$6,8 \cdot 10^{-10}$
3	$3,7 \cdot 10^{-10}$	$1,3 \cdot 10^{-9}$
4	$4,0 \cdot 10^{-9}$	$2,9 \cdot 10^{-9}$
5	$9,3 \cdot 10^{-10}$	$2,8 \cdot 10^{-9}$
6	$1,1 \cdot 10^{-9}$	$1,3 \cdot 10^{-9}$
7	$1,1 \cdot 10^{-9}$	$1,4 \cdot 10^{-9}$

El límite de detección del método AGNES propuesto para la determinación de plomo libre se calculó como 3 veces la desviación estándar de las concentraciones halladas en los blancos. Cada una de estas concentraciones fue calculada a partir de la intensidad obtenida y el parámetro h correspondiente. El valor de ese límite se estimó para 7 réplicas de agua de mar sintética sin metal adicionado. De esta forma, se obtuvo un límite de detección $6,34 \cdot 10^{-9}$ mol/L de plomo para un factor de preconcentración $Y = 50$ y de $3,06 \cdot 10^{-9}$ mol/L para $Y = 100$ (teniendo en cuenta que la concentración de plomo en los blancos para $Y = 100$ fue calculada como $c_M = I_f/2h$).

Igualmente, se evaluó el límite de cuantificación como 10 veces la desviación estándar de las concentraciones halladas en los blancos y se obtuvo un L.C. de $2,11 \cdot 10^{-8}$ mol/L para $Y = 50$ y $1,02 \cdot 10^{-8}$ mol/L para $Y = 100$.

Se puede observar que tanto el límite de detección como el de cuantificación son menores cuanto mayor sea Y, siendo la técnica más sensible para $Y=100$ que para $Y=50$.

(a) Aplicabilidad de AGNES en muestras de agua de mar sintética para la determinación de plomo libre

Se realizó un estudio de la aplicabilidad de la técnica AGNES a la evaluación de la concentración de plomo libre en muestras de agua de mar sintética. Para ello se llevó a cabo un procedimiento de validación en aguas de mar sintéticas a varios valores de pH. Los resultados obtenidos fueron validados por comparación con aquellos predichos por el programa MINTEQ.

Una vez obtenido el valor de h mediante calibración con NaNO_3 , dicho valor fue aplicado al análisis por AGNES de la muestra de agua de mar sintética. Así, y después de la calibración, la celda fue limpiada con HNO_3 2 mol/L y agua Milli Q para eliminar cualquier posible contaminación. Posteriormente, se procedió al estudio de la muestra de agua de mar sintética (preparada con las sales inorgánicas que están presentes en agua de mar [Grasshoff y col., 1983]). Se colocaron 25 mL de muestra en la celda y se realizó una adición de una disolución estándar de Pb(II) de forma que la concentración total de la muestra fuera del orden de $6 \cdot 10^{-7}$ mol/L de Pb(II) , y su pH fue modificado en el rango de 2,7-8,6. Las diferencias de pH entre la muestra de NaNO_3 en la calibración ($\text{pH}=3,44$) y la muestra sintética ($\text{pH}=2,7-8,6$) se consideran irrelevantes puesto que se ha encontrado que h permanece invariable en un gran intervalo de pH [Galceran y col., 2007]. Conociendo h y la corriente obtenida en la muestra tras la aplicación de AGNES, se aplicó la ecuación (3.56) y se obtuvo la concentración de metal libre presente en la muestra para cada pH. Esta concentración de metal libre fue comparada con la teórica propuesta por MINTEQ.

En la Tabla 3.10 pueden observarse los compuestos mayoritarios de Pb(II) predichos por MINTEQ que pueden encontrarse en el agua de mar sintética (con una concentración de Pb(II) total $6 \cdot 10^{-7}$ mol/L) para cada pH estudiado. Los compuestos mayoritarios en el agua de mar sintética son los clorocomplejos PbCl^+ y PbCl_2 (aq) en los pH 2,7; 5; 6 y 7. A pH 8,6 el compuesto mayoritario es el PbCO_3 (aq), alcanzando un 48,9% del total.

En general, al aumentar el pH se observa un incremento en la concentración de los compuestos PbCO_3 (aq), $\text{Pb(CO}_3)_2^{2-}$, Pb(OH)^+ y Pb(OH)_2 (aq). El resto de los compuestos disminuyen al aumentar el valor de pH, a excepción del PbHCO_3^+ , cuyo porcentaje es mayor cuando el pH es 7. La concentración de plomo libre disminuye al ir aumentando el pH.

Tabla 3.10. Compuestos mayoritarios de Pb(II) predichos por MINTEQ presentes en una muestra de agua de mar sintética para cinco valores de pH a 23 °C (en negrita: porcentaje más alto para cada pH) (Pb total $6 \cdot 10^{-7}$ mol/L)

Compuestos de Pb(II) ^a	Concentración del compuesto (mol/L (% sobre el total))				
	pH 2,7	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8,6
PbCl ⁺	$2,9 \cdot 10^{-7}$ (48,6%)	$2,9 \cdot 10^{-7}$ (48,3%)	$2,8 \cdot 10^{-7}$ (47,3%)	$2,7 \cdot 10^{-7}$ (43,9%)	$8,8 \cdot 10^{-8}$ (14,2%)
PbCl ₂ (aq)	$1,4 \cdot 10^{-7}$ (23,3%)	$1,4 \cdot 10^{-7}$ (23,2%)	$1,4 \cdot 10^{-7}$ (22,8%)	$1,3 \cdot 10^{-7}$ (21,1%)	$4,3 \cdot 10^{-8}$ (6,9%)
PbCl ₃ ⁻	$5,7 \cdot 10^{-8}$ (9,7%)	$5,7 \cdot 10^{-8}$ (9,7%)	$5,7 \cdot 10^{-8}$ (9,6%)	$5,3 \cdot 10^{-8}$ (8,8%)	$1,8 \cdot 10^{-8}$ (2,9%)
PbCl ₄ ²⁻	$1,9 \cdot 10^{-8}$ (3,1%)	$1,9 \cdot 10^{-8}$ (3,1%)	$1,8 \cdot 10^{-8}$ (3,1%)	$1,7 \cdot 10^{-8}$ (2,8%)	$5,9 \cdot 10^{-8}$ (1,0%)
PbSO ₄ (aq)	$2,6 \cdot 10^{-8}$ (4,5%)	$2,7 \cdot 10^{-8}$ (4,6%)	$2,7 \cdot 10^{-8}$ (4,5%)	$2,5 \cdot 10^{-9}$ (4,2%)	$8,4 \cdot 10^{-9}$ (1,4%)
Pb(SO ₄) ₂ ²⁻	$2,2 \cdot 10^{-9}$ (0,4%)	$2,3 \cdot 10^{-9}$ (0,4%)	$2,3 \cdot 10^{-9}$ (0,4%)	$2,1 \cdot 10^{-9}$ (0,4%)	$7,1 \cdot 10^{-10}$ (0,1%)
PbHCO ₃ ⁺	$9,8 \cdot 10^{-12}$ ($<0,01\%$)	$2,1 \cdot 10^{-9}$ (0,4%)	$1,2 \cdot 10^{-8}$ (2,0%)	$2,1 \cdot 10^{-8}$ (3,4%)	$6,2 \cdot 10^{-9}$ (1,0%)
PbCO ₃ (aq)	$6,2 \cdot 10^{-16}$ ($<0,01\%$)	$3,1 \cdot 10^{-11}$ ($<0,01\%$)	$1,8 \cdot 10^{-9}$ (0,3%)	$3,1 \cdot 10^{-8}$ (5,0%)	$3,0 \cdot 10^{-7}$ (48,9%)
Pb(CO ₃) ₂ ²⁻	$7,3 \cdot 10^{-26}$ ($<0,01\%$)	$1,9 \cdot 10^{-16}$ ($<0,01\%$)	$6,2 \cdot 10^{-13}$ ($<0,01\%$)	$1,9 \cdot 10^{-10}$ (0,03%)	$5,8 \cdot 10^{-8}$ (9,3%)
Pb(OH) ⁺	$2,7 \cdot 10^{-13}$ ($<0,01\%$)	$6,4 \cdot 10^{-11}$ (0,01%)	$6,4 \cdot 10^{-10}$ (0,1%)	$6,0 \cdot 10^{-9}$ (1,0%)	$6,5 \cdot 10^{-8}$ (10,4%)
Pb(OH) ₂ (aq)	$3,0 \cdot 10^{-20}$ ($<0,01\%$)	$1,6 \cdot 10^{-15}$ ($<0,01\%$)	$1,7 \cdot 10^{-13}$ ($<0,01\%$)	$1,5 \cdot 10^{-11}$ ($<0,01\%$)	$5,4 \cdot 10^{-9}$ (0,9%)
Pb ²⁺ (libre)	$6,0 \cdot 10^{-8}$ (10,0%)	$5,9 \cdot 10^{-8}$ (10,0%)	$5,8 \cdot 10^{-8}$ (9,7%)	$5,5 \cdot 10^{-8}$ (9,1%)	$1,8 \cdot 10^{-8}$ (2,9%)

^aEl resto de los compuestos de Pb(II) representan $< 0,1\%$

La Tabla 3.11 muestra los valores de metal libre y de la constante de estabilidad condicional K' de la muestra sintética a pH 2,7; 5; 6; 7 y 8,6 obtenidos por AGNES y MINTEQ. La constante se calculó a partir de los valores de concentración de metal libre y metal total en la superficie del electrodo, según la ecuación (3.27) para cada valor de pH:

$$c_M^0 = \frac{c_{M,T}^0}{1 + K'} \quad \longrightarrow \quad K' = \frac{c_{M,T}^0}{c_M^0} - 1 \quad (3.27)$$

Tabla 3.11. Valores medios de concentración de plomo libre y constante de estabilidad condicional obtenidos en agua de mar sintética utilizando AGNES. Comparación con los valores predichos por MINTEQ (Pb total en las muestras: $6 \cdot 10^{-7}$ mol/L ($n=3$ para cada pH))

Muestra	AGNES (agua de mar sintética)		MINTEQ	
	$C_{\text{Pb(II)}} \text{ libre (mol/L)}$	$K' \text{ experimental}$	$C_{\text{Pb(II)}} \text{ libre (mol/L)}$	$K' \text{ calculada}$
2,7	$5,6 \cdot 10^{-8} \pm 9,4 \cdot 10^{-10}$	$9,66 \pm 0,12$	$6,0 \cdot 10^{-8}$	9,00
5	$5,5 \cdot 10^{-8} \pm 8,0 \cdot 10^{-10}$	$9,68 \pm 0,16$	$5,9 \cdot 10^{-8}$	9,17
6	$5,5 \cdot 10^{-8} \pm 9,7 \cdot 10^{-10}$	$9,90 \pm 0,39$	$5,8 \cdot 10^{-8}$	9,34
7	$4,4 \cdot 10^{-8} \pm 1,4 \cdot 10^{-9}$	$12,90 \pm 0,18$	$5,5 \cdot 10^{-8}$	9,91
8,6	$1,6 \cdot 10^{-8} \pm 1,5 \cdot 10^{-9}$	$37,80 \pm 0,23$	$1,8 \cdot 10^{-8}$	32,33

Se puede observar cómo a mayor pH, menor es la concentración de plomo libre que existe en la muestra. Por ello, la constante de estabilidad condicional K' se ve incrementada claramente en medios más básicos. Los datos de metal libre y K' obtenidos por AGNES y MINTEQ son similares, aunque siempre se consiguen valores de metal libre ligeramente menores para AGNES. Estas diferencias pueden deberse a las constantes utilizadas por MINTEQ (las constantes en las base de datos normalmente son obtenidas para valores de concentración de metal y ligando más altos). Considerando las dificultades presentes en la determinación teórica de concentraciones de metal libre, los resultados experimentales han resultado ser muy satisfactorios. Así, se ha puesto de manifiesto la utilidad de AGNES como técnica válida para conseguir la concentración de metal libre en disolución.

(b) Aplicabilidad de AGNES en muestras de agua de mar real para la determinación de plomo libre

AGNES también se aplicó a muestras reales de agua de mar recogidas en la playa de Faro (Portugal). El pH de la muestra fue 8,52 y el carbono orgánico total (TOC) fue 2,01 mg/L. La metodología seguida fue la misma que para agua de mar sintética, en la que, previo al análisis de la muestra, se realizó un calibrado con NaNO_3 0,55 mol/L para conocer el parámetro h . Tras este calibrado, se pasó a analizar la muestra de agua de mar real, a la que se añadió un volumen conocido de una disolución patrón de Pb(II), de manera que la concentración total resultara de $6 \cdot 10^{-7}$ mol/L, y realizando el estudio a diferentes valores de pH (2,7; 5; 6; 7; 8,6).

Se realizó un análisis previo con MINTEQ de los posibles compuestos que pudieran estar presentes en el agua de mar real, teniendo en cuenta el dato de carbono orgánico total. Los resultados se muestran en la Tabla 3.12.

Tabla 3.12. Compuestos mayoritarios de Pb(II) predichos por MINTEQ presentes en una muestra de agua de mar real para cinco valores de pH a 23 °C (en negrita: porcentaje más alto para cada pH) (Pb total $6 \cdot 10^{-7}$ mol/L)

Compuestos de Pb(II) ^a	Concentración del compuesto (mol/L (% sobre el total))				
	pH 2,7	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8,6
PbCl ⁺	$2,9 \cdot 10^{-7}$ (47,7%)	$2,5 \cdot 10^{-7}$ (41,4%)	$2,3 \cdot 10^{-7}$ (37,8%)	$1,8 \cdot 10^{-7}$ (30,0%)	$5,5 \cdot 10^{-8}$ (9,3%)
PbCl ₂ (aq)	$1,4 \cdot 10^{-7}$ (23,0%)	$1,2 \cdot 10^{-7}$ (20,0%)	$1,1 \cdot 10^{-7}$ (18,3%)	$8,7 \cdot 10^{-8}$ (14,6%)	$2,7 \cdot 10^{-8}$ (4,5%)
PbCl ₃ ⁻	$5,9 \cdot 10^{-8}$ (9,6%)	$5,1 \cdot 10^{-8}$ (8,4%)	$4,7 \cdot 10^{-8}$ (7,7%)	$3,7 \cdot 10^{-8}$ (6,2%)	$1,1 \cdot 10^{-8}$ (1,9%)
PbCl ₄ ²⁻	$1,9 \cdot 10^{-8}$ (3,1%)	$1,7 \cdot 10^{-8}$ (2,7%)	$1,5 \cdot 10^{-8}$ (2,5%)	$1,2 \cdot 10^{-8}$ (2,0%)	$3,7 \cdot 10^{-9}$ (0,6%)
PbSO ₄ (aq)	$2,7 \cdot 10^{-8}$ (4,4%)	$2,4 \cdot 10^{-8}$ (3,9%)	$2,2 \cdot 10^{-8}$ (3,6%)	$1,7 \cdot 10^{-8}$ (2,8%)	$5,3 \cdot 10^{-9}$ (0,9%)
Pb(SO ₄) ₂ ²⁻	$2,2 \cdot 10^{-9}$ (0,4%)	$2,0 \cdot 10^{-9}$ (0,3%)	$1,9 \cdot 10^{-9}$ (0,3%)	$1,4 \cdot 10^{-9}$ (0,2%)	$4,5 \cdot 10^{-10}$ (0,1%)
PbHCO ₃ ⁺	$1,1 \cdot 10^{-11}$ ($<0,01\%$)	$1,6 \cdot 10^{-9}$ (0,3%)	$8,8 \cdot 10^{-9}$ (1,4%)	$1,4 \cdot 10^{-8}$ (2,4%)	$3,8 \cdot 10^{-9}$ (0,6%)
PbCO ₃ (aq)	$7,6 \cdot 10^{-16}$ ($<0,01\%$)	$2,0 \cdot 10^{-11}$ ($<0,01\%$)	$1,1 \cdot 10^{-9}$ (0,2%)	$4,7 \cdot 10^{-8}$ (7,9%)	$2,1 \cdot 10^{-7}$ (34,7%)
Pb(CO ₃) ₂ ²⁻	$1,1 \cdot 10^{-25}$ ($<0,01\%$)	$8,9 \cdot 10^{-17}$ ($<0,01\%$)	$3,0 \cdot 10^{-13}$ ($<0,01\%$)	$6,8 \cdot 10^{-10}$ (0,1%)	$4,2 \cdot 10^{-8}$ (7,1%)
Pb(OH) ⁺	$3,06 \cdot 10^{-13}$ ($<0,01\%$)	$4,8 \cdot 10^{-11}$ (0,01%)	$4,4 \cdot 10^{-10}$ (0,1%)	$8,6 \cdot 10^{-9}$ (1,5%)	$4,5 \cdot 10^{-8}$ (7,5%)
Pb(OH) ₂ (aq)	$3,6 \cdot 10^{-20}$ ($<0,01\%$)	$1,0 \cdot 10^{-15}$ ($<0,01\%$)	$9,5 \cdot 10^{-14}$ ($<0,01\%$)	$4,8 \cdot 10^{-11}$ ($<0,01\%$)	$4,1 \cdot 10^{-9}$ (0,7%)
Pb-Mat Org	$1,0 \cdot 10^{-8}$ (1,7%)	$8,8 \cdot 10^{-8}$ (14,3%)	$1,2 \cdot 10^{-7}$ (20,1%)	$1,6 \cdot 10^{-7}$ (26,0%)	$1,8 \cdot 10^{-7}$ (30,0%)
Pb ²⁺ (libre)	$6,0 \cdot 10^{-8}$ (9,8%)	$5,2 \cdot 10^{-8}$ (8,5%)	$4,8 \cdot 10^{-8}$ (7,8%)	$3,6 \cdot 10^{-8}$ (6,1%)	$1,1 \cdot 10^{-8}$ (1,9%)

^aEl resto de los compuestos de Pb(II) representan $< 0,1\%$

Los compuestos mayoritarios en el agua de mar real a pH 2,7 y 5 son los clorocomplejos PbCl⁺ y PbCl₂ (aq). A partir de pH 6 el complejo formado entre Pb y la materia orgánica va siendo mayoritario, hasta llegar a un porcentaje del 30% sobre el total a pH 8,6. Además, a este pH también es importante la presencia de PbCO₃ (aq), con un 34%, algo menos que en agua de mar sintética.

En general, al aumentar el pH se observa un incremento en la concentración de los compuestos PbCO_3 (aq), $\text{Pb}(\text{CO}_3)_2^{2-}$, $\text{Pb}(\text{OH})^+$ y $\text{Pb}(\text{OH})_2$ (aq), al igual que ocurría en el agua de mar sintética. Sin embargo, en este caso hay que añadir la presencia del complejo formado entre Pb(II) y la materia orgánica, cuya concentración se va incrementando al aumentar el pH. El resto de los compuestos disminuyen al aumentar el valor de pH, a excepción del PbHCO_3^+ , cuyo porcentaje es mayor cuando el pH es 7. La concentración de plomo libre disminuye al ir aumentando el pH.

Los resultados de la aplicación de AGNES a la muestra de agua de mar real y su comparación con los obtenidos por MINTEQ están detallados en la Tabla 3.13. Como se esperaba, los valores de K' presentaron el mismo patrón de comportamiento con respecto al pH que en la muestra de agua de mar sintética, pero esta vez los valores son ligeramente mayores debido a la presencia de materia orgánica en la muestra de agua de mar real. Además, se puede observar cómo los valores de metal libre proporcionados por AGNES y MINTEQ para el agua de mar real a todos los valores de pH son muy similares. En estas condiciones, los valores de K' son del mismo orden que los encontrados en agua de mar sintética para los pH 2,7; 5; 6 y 7. Sin embargo, para valores ligeramente básicos (valor típico de pH en agua de mar: 8,6), el plomo se encuentra mucho más complejoado y por tanto el valor de K' es mayor que en agua de mar sintética.

Tabla 3.13. Valores medios de concentración de plomo libre y constante de estabilidad condicional obtenidos en agua de mar real utilizando AGNES. Comparación con los valores predichos por MINTEQ (Pb total en las muestras: $6 \cdot 10^{-7}$ mol/L; $n=3$ para cada pH)

Muestra pH	AGNES (agua de mar real)		MINTEQ	
	$C_{\text{Pb(II) libre}} \text{ (mol/L)}$	$K' \text{ experimental}$	$C_{\text{Pb(II) libre}} \text{ (mol/L)}$	$K' \text{ calculada}$
2,7	$5,5 \cdot 10^{-8} \pm 3,5 \cdot 10^{-9}$	$9,97 \pm 0,40$	$6,0 \cdot 10^{-8}$	9,00
5	$5,4 \cdot 10^{-8} \pm 1,2 \cdot 10^{-9}$	$10,06 \pm 0,23$	$5,2 \cdot 10^{-8}$	10,54
6	$4,7 \cdot 10^{-8} \pm 1,4 \cdot 10^{-9}$	$11,66 \pm 0,27$	$4,8 \cdot 10^{-8}$	11,50
7	$3,1 \cdot 10^{-8} \pm 1,6 \cdot 10^{-9}$	$18,29 \pm 0,96$	$3,6 \cdot 10^{-8}$	15,67
8,6	$1,06 \cdot 10^{-8} \pm 9,2 \cdot 10^{-10}$	$55,01 \pm 4,7$	$1,1 \cdot 10^{-8}$	53,55

3.6.2. SSCP

3.6.2.1. Repetibilidad de la señal analítica τ en SCP

Para estudiar la repetibilidad de la técnica de análisis de Pb(II) en SCP se realizaron 6 análisis diferentes en las condiciones detalladas en la sección 3.5.2.2.2.(1), sobre muestras de plomo en NaNO_3 0,55 mol/L con una concentración de metal de $1,4 \cdot 10^{-6}$ mol/L. El potencial de deposición que se utilizó fue -0,5 V, por ser un valor intermedio en el rango de potenciales de deposición utilizado para realizar las curvas SSCP.

La precisión se calculó de la misma manera que en el capítulo 2. Para ello, el cálculo del valor de la distribución t se realizó teniendo en cuenta los grados de libertad del sistema $n-1=5$ (siendo n el número de experimentos realizados) y se aceptó un intervalo de confianza del 95%. Así, para 5 grados de libertad y un intervalo de confianza del 95%, el valor de t tabulado de dos colas es 2,571.

La media de los 6 experimentos fue de 10,8 s con una desviación estándar de 1,0 s. A partir de estos valores, se obtuvo la precisión de la medida que fue del 9,5%. Esta reproducibilidad obtenida fue muy satisfactoria, confirmando las adecuadas características analíticas de la técnica SCP. En la Tabla 3.14 se muestran los datos obtenidos, incluyendo la desviación estándar (s), desviación estándar relativa (RSD) y la precisión de la medida de τ .

Tabla 3.14. Reproducibilidad de la medida de τ para Pb(II) en disolución de NaNO_3 mediante la técnica SCP aplicada para un potencial de deposición intermedio ($[\text{Pb(II)}]=1,4 \cdot 10^{-6}$ mol/L; $[\text{NaNO}_3]=0,55$ mol/L; $n=6$)

Parámetros	Valores
τ (s)	9,93; 9,47; 10,55; 10,95; 11,94; 11,71
Grados de libertad (n-1)	5
Intervalo de confianza	95%
t	2,571
Media	10,8
s	1,0
RSD (%)	9,0
Precisión (%)	9,5

3.6.2.2. Reproducibilidad de las curvas SSCP

Asimismo, también se estudió la reproducibilidad de las curvas SSCP en 4 muestras de plomo en NaNO_3 0,55 mol/L con una concentración de metal de $1,4 \cdot 10^{-6}$ mol/L (Figura 3.20). Los parámetros característicos de dichas curvas, E^0 , $E_{1/2}$ y τ^* , se muestran en la Tabla 3.15. Como se puede observar, la técnica SSCP es muy reproducible y presenta poca variabilidad en los resultados.

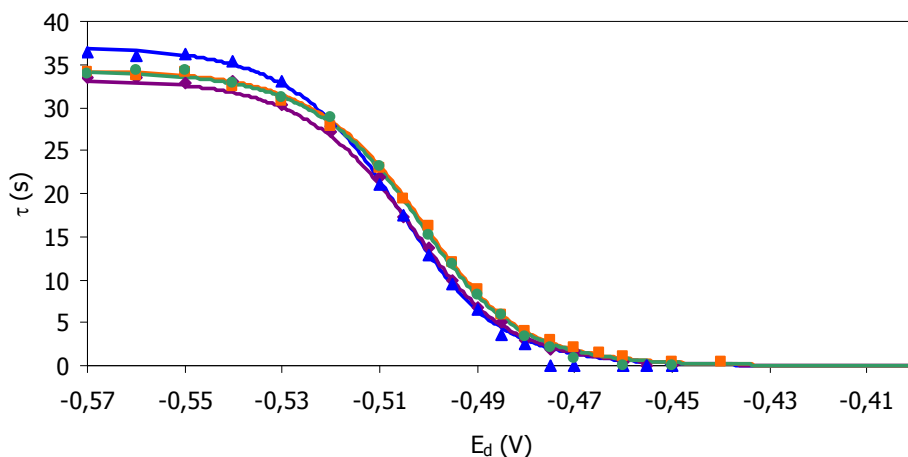


Figura 3.20. Reproducibilidad de las curvas SSCP (tiempo de transición frente a potencial de deposición) para una disolución de Pb(II) en NaNO_3 ($[\text{Pb(II)}] = 1,4 \cdot 10^{-6}$ mol/L; $[\text{NaNO}_3] = 0,55$ mol/L) (\blacktriangle , \blacksquare , \bullet , \blacklozenge : valores experimentales; —: curvas teóricas ajustadas)

Tabla 3.15. Reproducibilidad de los parámetros significativos de las curvas SSCP de una disolución de Pb(II) en NaNO_3 : valores de tiempo de transición límite τ^* , potencial de deposición de semi-onda $E_{1/2}$ y potencial redox estándar E^0 (curvas SSCP de la Fig. 3.20)

Réplica	τ^* (s)	$E_{1/2}$ (V)	E^0 (V)
1	33,3	-0,50275	-0,468
2	36,3	-0,50475	-0,469
3	34,3	-0,50025	-0,466
4	34,2	-0,50075	-0,466

3.6.2.3. Aplicación de SSCP a muestras sintéticas de agua de mar

Previamente a la aplicación de la técnica SSCP a muestras sintéticas, se debe realizar una curva SSCP con una disolución de NaNO_3 en ausencia de ligando, cuya concentración debe ser similar a la fuerza iónica de la muestra a estudiar (en este caso 0,55 mol/L) y con una concentración conocida de Pb(II). Esta curva se denomina curva de calibración de SSCP, y será aquella con respecto a la cual se compararán los parámetros importantes de la curva correspondiente de la muestra que se quiere analizar, es decir, τ^* y $E_{1/2}$. Una vez obtenidos los datos experimentales para la disolución de metal en NaNO_3 0,55 mol/L, y ajustada la curva teórica (según el procedimiento explicado en 3.5.2.2.2.(1)), se calcularon los valores de $\tau_{M, \text{corregido}}^*$ y $E_{1/2, M}$ para 3 réplicas y resultaron ser $16,48 \pm 0,33$ s y $-0,48305 \pm 0,00246$ V, respectivamente.

Después de realizar dicha calibración, se pasó a estudiar la muestra de agua de mar sintética, a la cual se le añadió una cantidad específica de Pb(II) para que su concentración total fuera de $6 \cdot 10^{-7}$ mol/L (previo al análisis con SSCP, se estudió su concentración de metal libre con AGNES). Se comenzó por estudiar la muestra ajustada a un pH de 2,7. Se aplicó SSCP y se obtuvieron los valores experimentales de τ para cada potencial de deposición aplicado (Tabla 3.16). A partir de estos valores, se calculó el valor de τ_{M+L}^* , como promedio de los 3 valores más altos, resultando en un valor de 16,23 s.

Tabla 3.16. Valores de τ (s) para cada valor de potencial de deposición aplicado en SCP, en una muestra de agua de mar sintética a pH 2,7 ($[\text{Pb(II)}] = 6 \cdot 10^{-7}$ mol/L)

E_d (V)	-0,57	-0,56	-0,55	-0,54	-0,53	-0,52	-0,51	-0,5	-0,49
τ (s)	16,65	16,10	15,94	15,87	15,31	13,99	12,08	8,86	5,19
E_d (V)	-0,48	-0,475	-0,47	-0,465	-0,46	-0,45	-0,44	-0,43	-0,42
τ (s)	2,51	1,27	1,17	0,89	0,87	0,15	0,20	0	0

Estos datos se representaron en una gráfica de τ frente a E_d , obteniéndose la curva SSCP experimental. Posteriormente, se procedió al ajuste de la curva teórica, tal y como se indicó en la sección 3.5.2.2.2.(2). Una vez que la curva teórica fue similar a la de los datos experimentales, se procedió al cálculo del valor de $E_{1/2, M+L}$. En la Tabla 3.17 se muestra la hoja Excel para la muestra de agua de mar sintética a pH 2,7.

Tabla 3.17. Hoja Excel diseñada para obtener la curva teórica SSCP para una muestra de agua de mar sintética a pH 2,7 ($[Pb(II)] = 6 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$)

Eje x: E_d (V)	θ	τ_d (s)	Eje y: τ (s)	\bar{E}_d (V)	$\Delta y/\Delta x$ (s/V)
-0,57	0,00017	8540,14	16,191		
-0,5695	0,00018	8211,96	16,189	-0,56975	-3,41
-0,569	0,00019	7896,38	16,187	-0,56925	-3,54
-0,5685	0,00019	7592,93	16,186	-0,56875	-3,68
:	:	:	:	:	:
-0,496	0,05723	25,87	7,693	-0,49625	-379,29
-0,4955	0,05952	24,87	7,503	-0,49575	-379,64
-0,495	0,06190	23,92	7,313	-0,49525	-379,54
:	:	:	:	:	:
-0,4015	94,22169	$1,57 \cdot 10^{-2}$	$5,67 \cdot 10^{-3}$	-0,40175	-0,45
-0,401	97,98722	$1,51 \cdot 10^{-2}$	$5,45 \cdot 10^{-3}$	-0,40125	-0,44
-0,4005	101,90324	$1,45 \cdot 10^{-2}$	$5,24 \cdot 10^{-3}$	-0,40075	-0,42
-0,4	105,97575	$1,40 \cdot 10^{-2}$	$5,04 \cdot 10^{-3}$	-0,40025	-0,40

A partir de esta hoja Excel, se obtuvo que el valor de $E_{1/2,M+L}$ para esta réplica de la muestra sintética a pH 2,7 fue de -0,49575 V. Teniendo en cuenta que $E_{1/2,M}$ calculado anteriormente durante la calibración de la disolución de plomo en ausencia de ligando fue de -0,48125 V y utilizando el factor de corrección ΔE descrito en la sección 3.5.2.2.2.(1), se llegó a un valor de $\Delta E_{d,1/2}$ igual a:

$$\Delta E_{d,1/2} = E_{1/2,M+L} - (E_{1/2,M} - \Delta E) = -0,49575 - (-0,48125 - (-1,36 \cdot 10^{-2})) = -2,81 \cdot 10^{-2} \text{ V}$$

Se calculó también el valor de $\tau_{M,\text{corregido}}^*$ a partir del τ_M^* de la calibración, según la ecuación (3.68):

$$\begin{aligned} \tau_{M,\text{corregido}}^* &= c_{M,T} \text{ (en la muestra de estudio)} \cdot \frac{\tau_M^*}{c_{M,T} \text{ (en la disolución de calibración)}} = \\ &= 6 \cdot 10^{-7} \cdot \frac{39,19}{1,4 \cdot 10^{-6}} = 16,8 \text{ s} \end{aligned}$$

Con el valor de $\Delta E_{d,1/2}$ ($-2,81 \cdot 10^{-2} \text{ V}$), el valor calculado de τ_{M+L}^* (16,23 s), y el valor de $\tau_{M,\text{corregido}}^*$ (16,8 s), se calculó el valor de K' utilizando la ecuación:

$$\Delta E_{d,1/2} = -\frac{RT}{nF} \left[\ln(1 + K') + \ln\left(\tau_{M+L}^* / \tau_M^*\right) \right] \quad (3.32)$$

Así, el valor de K' obtenido para la muestra sintética de agua de mar a pH 2,7 fue de 8,36.

De esta misma manera se calculó τ^* , $E_{1/2}$ y K' para todas las muestras de agua de mar sintética y real estudiadas a los valores de pH seleccionados.

En la Figura 3.21, se muestran los datos de SSCP experimentales para la muestra sintética ajustada a cinco valores de pH, junto con las curvas teóricas ajustadas utilizando el procedimiento descrito en 3.5.2.2.2.(2). La comparación de las curvas SSCP de las muestras de estudio con respecto a la curva SSCP de la calibración (metal en NaNO_3 0,55 mol/L) se realizó normalizando las curvas de las muestras de estudio con respecto a la de calibración, de forma que los valores de tiempo de transición de la muestra fueron divididos por el tiempo de transición límite corregido obtenido en la SSCP de calibración $\tau_{M, \text{corregido}}^*$ y a los valores de potencial estándar se les sustrajo el valor de E^0 de la curva de calibración E_M^0 .

Se encontró que los datos experimentales están en perfecta consonancia con aquellos predichos teóricamente, por lo que la expresión utilizada se ajusta muy bien para muestras de este tipo, en las que no están presentes ligandos heterogéneos, al ser una muestra de agua de mar sintética preparada sin ligandos orgánicos.

A valores bajos de pH (2,7; 5; 6 y 7), el tiempo de transición límite de la muestra es prácticamente el mismo que en la curva de calibrado, por lo que no existe pérdida de labilidad alguna. Sin embargo, la curva se ve desplazada hacia la izquierda a lo largo del eje x, indicando que hay presencia de ligandos que complejan al metal (en este caso de muestra sintética, los ligandos presentes son iones inorgánicos). A pH 8,6 (pH natural del agua de mar) se observa una disminución apreciable en τ^* con respecto a la muestra de Pb(II) en NaNO_3 , y un desplazamiento de la curva hacia la izquierda muy acusado, indicando que hay presencia de ligandos que complejan el metal y que los complejos formados no son lábiles.

Los valores de K' fueron calculados a partir de la expresión (3.32) para el desplazamiento del potencial de semionda $\Delta E_{d,1/2}$, y se pueden observar en la Tabla 3.18.

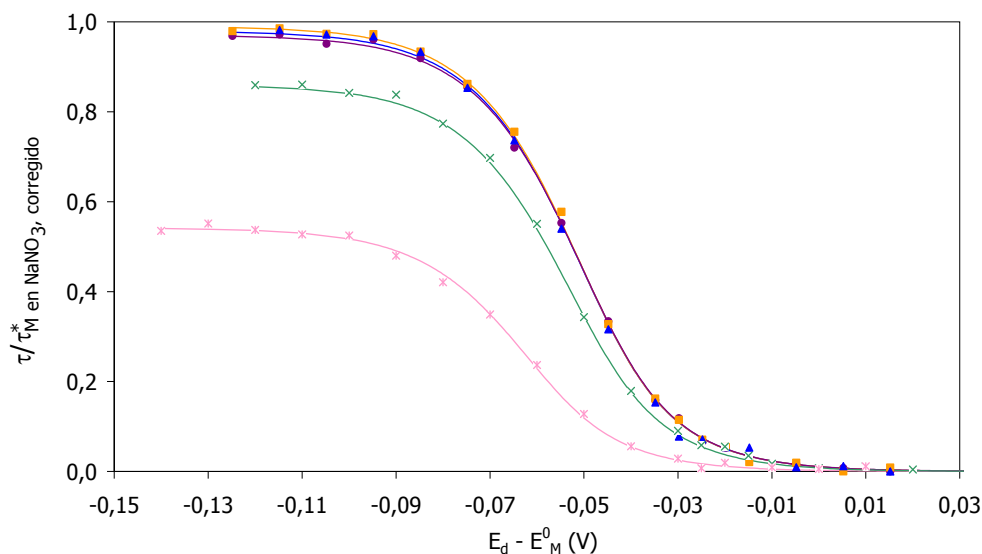


Figura 3.21. Datos experimentales de SSCP medidos para una muestra sintética de agua de mar a diferentes valores de pH ($[Pb(II)] = 6 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$): 2,7 (\blacktriangle), 5 (\blacksquare), 6 (\bullet), 7 (\times) y 8,6 (\times). (—, —, —, —, — : curvas teóricas ajustadas)

Tabla 3.18. Valores medios del tiempo de transición límite τ^* , potencial de deposición de semi-onda $E_{1/2}$ y constante de estabilidad condicional K' obtenidos en agua de mar sintética a diferentes valores de pH utilizando SSCP ($[Pb(II)] = 6 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$; $n=3$)

pH	SSCP en agua de mar sintética		
	τ^* (s)	$E_{1/2}$ (V)	K'^a
Calibrado (3,44)	$16,48 \pm 0,33^b$	$-0,48305 \pm 0,00246^d$	-
2,7	$16,23 \pm 1,34^c$	$-0,49575 \pm 0,00318^e$	$8,14 \pm 0,71$
5	$16,09 \pm 0,14^c$	$-0,49525 \pm 0,00141^e$	$7,88 \pm 0,04$
6	$15,99 \pm 0,29^c$	$-0,49525 \pm 0,00212^e$	$7,96 \pm 0,23$
7	$13,46 \pm 1,56^c$	$-0,50225 \pm 0,00318^e$	$12,66 \pm 1,71$
8,6	$9,14 \pm 1,08^c$	$-0,51125 \pm 0,00141^e$	$38,57 \pm 1,66$

^aValores de K' obtenido de la ecuación para el desplazamiento del potencial de semionda $\Delta E_{d,1/2}$ (ecuación (3.32))

^b Valor de $\tau_{M, \text{correctado}}^*$ ^d Valor de $E_{1/2, M}$

^c Valores de τ_{M+L}^* ^e Valores de $E_{1/2, M+L}$

Para valores de pH 2,7; 5 y 6, el tiempo de transición límite se mantiene constante y con él, la constante de estabilidad condicional. Sin embargo, cuando el pH aumenta hacia valores más básicos, τ^* decrece debido a que existe una mayor proporción de metal complejoado que libre, y por tanto, la constante de estabilidad condicional aumenta.

3.6.2.4. Aplicación de SSCP a muestras reales de agua de mar

SSCP se aplicó a la muestra real de agua de mar recogida en la playa de Faro (Portugal), después de haber sido estudiada su concentración de metal libre mediante AGNES. La concentración total en la muestra fue $6,0 \cdot 10^{-7}$ mol/L y el contenido de carbono orgánico, evaluado mediante el parámetro TOC, fue de 2,01 mg/L.

En la Figura 3.22 se muestran los datos experimentales y las curvas ajustadas teóricas. Los datos fueron normalizados con respecto al tiempo de transición límite y el potencial estándar para Pb(II) en NaNO_3 en ausencia de ligando.

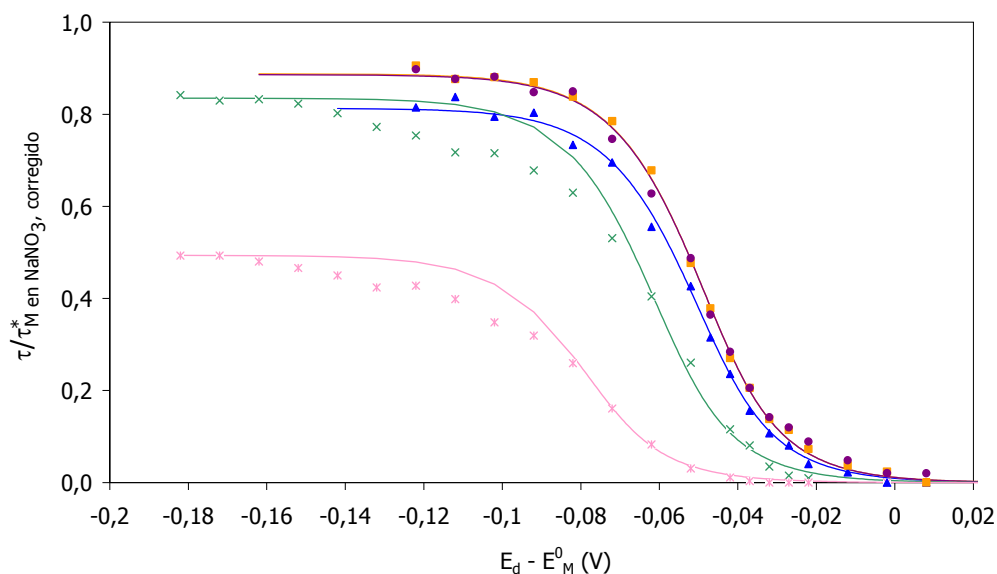


Figura 3.22. Datos experimentales de SSCP medidos para una muestra real de agua de mar a diferentes valores de pH ($[\text{Pb(II)}]=6 \cdot 10^{-7}$ mol/L): 2,7 (▲), 5 (■), 6 (●), 7 (×) y 8,6 (×). (—, —, —, —, —: curvas teóricas ajustadas)

Se puede observar que para pH 2,7; 5 y 6 los datos experimentales concuerdan perfectamente con la curva teórica, por lo que la expresión utilizada se ajusta muy bien para muestra real a pH ácidos, en los que los posibles ligandos heterogéneos presentes en

la muestra (que forman parte de la materia orgánica presente en agua de mar) no forman complejos estables con el metal o, si lo forman, resultan ser lábiles.

Sin embargo, a partir de valores más altos de pH (7 y 8,6) los datos discrepan de los teóricos puesto que la curva formada por los puntos experimentales se hace más plana, con una pendiente muchos menos acusada con respecto a la predicha teóricamente. Esto puede ser debido a la presencia de ligandos heterogéneos, como por ejemplo materia orgánica natural en disolución [van Leeuwen y Town, 2003; Town, 2008].

A valores bajos de pH (2,7; 5; 6 y 7), no existe pérdida de labilidad, puesto que el tiempo de transición límite de la muestra es similar al obtenido en la curva de calibrado. Tal y como ocurre en la muestra sintética, las curvas se ven desplazadas hacia la izquierda, indicando que hay presencia de ligandos que complejan al metal (en este caso, los ligandos presentes son sales inorgánicas y materia orgánica, probablemente ácidos húmicos y/o fúlvicos).

A pH 8,6 (pH natural del agua de mar) se observa una disminución apreciable en τ^* con respecto a la del caso de metal sin ligandos, y un desplazamiento de la curva hacia la izquierda muy acusado. A pH 8,6 existe una pérdida de labilidad bastante acentuada. En este caso, puesto que los datos experimentales no se ajustan adecuadamente a la curva teórica, los valores calculados de K' no serán fiables.

Aún así, K' fue calculada para todos los valores de pH, utilizando la expresión (3.32) y sus valores pueden observarse en la Tabla 3.19.

Igual que ocurría en el caso de agua de mar sintética, la constante de estabilidad condicional para plomo permanece aproximadamente constante para valores bajos de pH, mientras que aumenta cuando el pH es 7 y 8,6.

Para entender el comportamiento del agua de mar real a valores altos de pH, se estudió una muestra de agua de mar sintética, a pH 8,6 con $6 \cdot 10^{-7}$ mol/L de Pb(II), a la que se le añadió tres cantidades diferentes de materia orgánica (ácidos fúlvicos). En la Figura 3.23, se muestran los datos experimentales y las curvas teóricas, normalizadas como se ha indicado anteriormente, de agua de mar sintética con diferentes concentraciones de ácidos fúlvicos (1, 2 y 5 mg/L).

Cuando se añade ácido fúlvico a una muestra de agua de mar sintética, las pendientes de las curvas disminuyen, las curvas SSCP se aplanan, al igual que ocurría en el caso de agua de mar real, en la que se observó presencia de ligandos heterogéneos. De este modo, queda demostrado que un cambio en la pendiente de la curva es una clara indicación de presencia de ligandos heterogéneos en la disolución.

Tabla 3.19. Valores medios del tiempo de transición límite τ^* , potencial de deposición de semi-onda $E_{1/2}$ y constante de estabilidad condicional K' obtenidos en agua de mar real a diferentes valores de pH utilizando SSCP ($[Pb(II)] = 6 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$; $n=3$)

pH	SSCP en agua de mar real		
	τ^* (s)	$E_{1/2}$ (V)	K'^a
Calibrado (pH 3,44)	$16,39 \pm 0,19^b$	$-0,48252 \pm 0,01924^d$	-
2,7	$13,28 \pm 1,17^c$	$-0,48208 \pm 0,01556^e$	$11,86 \pm 0,85$
5	$15,69 \pm 1,83^c$	$-0,48525 \pm 0,01582^e$	$8,56 \pm 0,74$
6	$15,75 \pm 1,83^c$	$-0,48525 \pm 0,01636^e$	$8,84 \pm 0,49$
7	$12,97 \pm 1,54^c$	$-0,52975 \pm 0,00141^e$	$25,34 \pm 2,00$
8,6	$8,02 \pm 1,44^c$	$-0,54650 \pm 0,00106^e$	$158,42 \pm 26,29$

^a Valores de K' obtenido de la ecuación para el desplazamiento del potencial de semionda $\Delta E_{d,1/2}$ (ecuación (3.32))

^b Valor de $\tau_{M, \text{corregido}}^*$ ^d Valor de $E_{1/2, M}$

^c Valores de τ_{M+L}^* ^e Valores de $E_{1/2, M+L}$

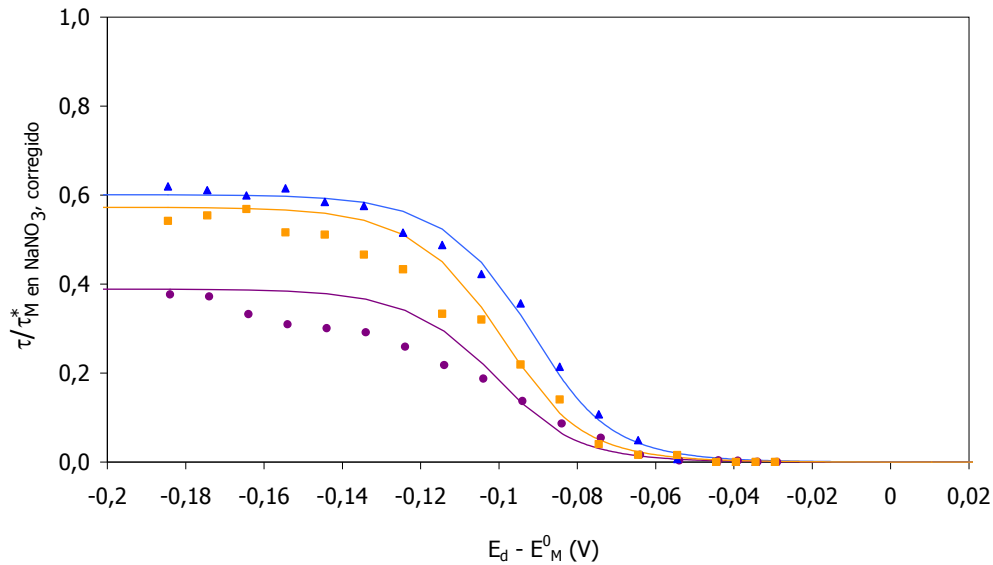


Figura 3.23. Datos experimentales de SSCP medidos para una muestra sintética de agua de mar a pH 8,6 con diferentes concentraciones de ácidos fúlvicos ($[Pb(II)] = 6 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$; $[\text{ácidos fúlvicos}] = 1$ (\blacktriangle), 2 (\blacksquare) y 5 mg/L (\bullet). (—, —, —: curvas teóricas ajustadas)

3.6.3. Comparación entre AGNES y SSCP

AGNES proporciona la concentración de metal libre directamente, según la ecuación (3.56), mientras que SSCP proporciona el valor de la constante de estabilidad condicional K' , mediante el desplazamiento del potencial de deposición de semi-onda (ecuación (3.32)). Por lo tanto, para comparar los resultados es necesario calcular K' a partir de la concentración de metal libre utilizando la ecuación (3.27) en caso de AGNES, o de manera inversa en el caso de SSCP.

El valor de la constante calculado vía AGNES se evalúa mediante la concentración de metal libre en el seno de la disolución; sin embargo el obtenido por SSCP corresponde a una media de las constantes de estabilidad a través de toda la capa de difusión (que abarca desde el valor en el seno de la disolución hasta el valor en la superficie del electrodo [Garcés y col., 1996]).

En las Tablas 3.20 y 3.21 se comparan los valores de K' y concentración de metal libre obtenidos mediante SSCP y AGNES para agua de mar sintética y agua de mar real, y se comparan con la K' calculada a partir de la concentración de metal libre proporcionada por MINTEQ.

Tabla 3.20. Comparación de valores medios de concentración libre de metal y constante de estabilidad condicional K' obtenidos en agua de mar sintética utilizando AGNES y SSCP ($[Pb(II)] = 6 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$; $n=3$)

pH	AGNES (agua de mar sintética)		SSCP (agua de mar sintética)		MINTEQ
	$C_{Pb(II)} \text{ libre (mol/L)}$	$K' ^a$	$C_{Pb(II)} \text{ libre (mol/L)} ^b$	K'	K'
2,7	$5,6 \cdot 10^{-8} \pm 9,4 \cdot 10^{-10}$	$9,66 \pm 0,12$	$6,6 \cdot 10^{-8} \pm 9,0 \cdot 10^{-9}$	$8,14 \pm 0,71$	9,00
5	$5,5 \cdot 10^{-8} \pm 8,0 \cdot 10^{-10}$	$9,68 \pm 0,16$	$6,8 \cdot 10^{-8} \pm 1,7 \cdot 10^{-9}$	$7,88 \pm 0,04$	9,17
6	$5,5 \cdot 10^{-8} \pm 9,7 \cdot 10^{-10}$	$9,90 \pm 0,39$	$6,7 \cdot 10^{-8} \pm 1,4 \cdot 10^{-9}$	$7,96 \pm 0,23$	9,34
7	$4,4 \cdot 10^{-8} \pm 1,4 \cdot 10^{-9}$	$12,90 \pm 0,18$	$4,4 \cdot 10^{-8} \pm 5,9 \cdot 10^{-9}$	$12,52 \pm 1,71$	9,91
8,6	$1,6 \cdot 10^{-8} \pm 1,5 \cdot 10^{-9}$	$37,80 \pm 0,23$	$1,5 \cdot 10^{-8} \pm 5,9 \cdot 10^{-9}$	$38,57 \pm 1,66$	32,33

^a Valores calculados a partir de la concentración de $Pb(II)$ libre encontrada en AGNES

^b Valores calculados a partir de la constante de estabilidad K' encontrada en SSCP

Tabla 3.21. Comparación de valores medios de concentración libre de metal y constante de estabilidad condicional K' obtenidos en agua de mar real utilizando AGNES y SSCP ($[Pb(II)] = 6 \cdot 10^{-7} \text{ mol/L}$; $n=3$)

pH	AGNES (agua de mar real)		SSCP (agua de mar sintética)		MINTEQ
	$C_{Pb(II)} \text{ libre (mol/L)}$	$K' ^a$	$C_{Pb(II)} \text{ libre (mol/L)} ^b$	K'	
2,7	$5,5 \cdot 10^{-8} \pm 3,5 \cdot 10^{-9}$	$9,97 \pm 0,40$	$4,7 \cdot 10^{-8} \pm 5,8 \cdot 10^{-9}$	$11,86 \pm 0,85$	9,00
5	$5,4 \cdot 10^{-8} \pm 1,2 \cdot 10^{-9}$	$10,06 \pm 0,23$	$6,3 \cdot 10^{-8} \pm 5,9 \cdot 10^{-9}$	$8,56 \pm 0,74$	10,54
6	$4,7 \cdot 10^{-8} \pm 1,4 \cdot 10^{-9}$	$11,66 \pm 0,27$	$6,1 \cdot 10^{-8} \pm 5,2 \cdot 10^{-9}$	$8,84 \pm 0,49$	11,50
7	$3,1 \cdot 10^{-8} \pm 1,6 \cdot 10^{-9}$	$18,29 \pm 0,96$	$2,3 \cdot 10^{-8} \pm 1,0 \cdot 10^{-9}$	$25,34 \pm 2,00$	15,67
8,6	$1,06 \cdot 10^{-8} \pm 9,2 \cdot 10^{-10}$	$55,01 \pm 4,70$	$3,8 \cdot 10^{-8} \pm 5,1 \cdot 10^{-10}$	$158,42 \pm 26,29$	53,55

^a Valores calculados a partir de la concentración de Pb(II) libre encontrada en AGNES

^b Valores calculados a partir de la constante de estabilidad K' encontrada en SSCP

Los valores de K' obtenidos por SSCP y AGNES para agua de mar sintética fueron similares para todos los valores de pH, implicando que ambas técnicas son igualmente válidas para calcular la constante de estabilidad condicional de plomo en muestras que contengan ligandos inorgánicos, como pueden ser los iones de las sales presentes en agua de mar.

En agua de mar real, los resultados obtenidos de K' a pH 2,7; 5 y 6 con SSCP y AGNES fueron comparables. Sin embargo, al aumentar el pH hacia valores básicos, existe una gran diferencia entre los proporcionados por SSCP y por AGNES. La K' obtenida en SSCP es mucho más alta que la calculada por AGNES. En estas condiciones, la curva de SSCP se aplan y se ensancha a lo largo del eje x, sin ajustarse a la curva teórica, por lo que los datos de K' no son reales ni comparables con aquéllos proporcionados por AGNES.

3.7. Conclusiones

En este capítulo se ha presentado la posibilidad de aplicar dos técnicas recientes al análisis de la especiación de Pb(II) en muestras de agua de mar. Se han aplicado las técnicas AGNES y SSCP simultáneamente tanto a agua de mar sintética como real y se han comparado las constantes de estabilidad condicional y la concentración de metal libre proporcionadas por ambos métodos.

Se ha encontrado que los resultados de AGNES concuerdan perfectamente con los datos calculados a partir de MINTEQ. Además, existe una buena correlación entre los datos proporcionados por SSCP y AGNES en muestras reales y sintéticas para todos los valores de pH estudiados, con la excepción de los casos de pH 7 y 8,6 en agua de mar real. Este hecho confirma que la metodología de cálculo utilizada en SSCP para determinar la concentración libre de metal es válida para la muestra de agua de mar sintética a todos los pH y para las muestras de agua de mar real a los pH 2,7; 5 y 6. En el caso de pH 7 y 8,6 se puede observar la influencia de los ligandos presentes en dicha muestra (que posiblemente sean heterogéneos dada la forma de la curva experimental), y la curva teórica no se puede ajustar de forma adecuada a los puntos experimentales, por lo que el cálculo que se ha aplicado en SSCP para calcular la concentración libre de metal no es válido en muestras con ligandos heterogéneos. En este tipo de sistemas complejos, SSCP es capaz de detectar la presencia de ligandos heterogéneos mientras que AGNES mide sin errores la concentración de metal libre en el seno de la disolución.

Por su parte, SSCP proporciona una mayor información sobre la especiación de Pb(II) que AGNES, aunque esta segunda técnica es una herramienta muy útil en la determinación de metal libre puesto que provee datos robustos independientemente de las características del sistema. Por ello, el uso simultáneo de ambos métodos tiene grandes ventajas debido a la información complementaria que facilitan.

Capítulo 4

*Evaluación de la contaminación metálica en la
Bahía de Algeciras*

4

Evaluación de la contaminación metálica en la Bahía de Algeciras

En este capítulo se estudia la calidad medioambiental de las aguas afectadas por una intensa actividad antropogénica, mediante la evaluación de los niveles metálicos totales y su especiación química. La zona de estudio seleccionada es la Bahía de Algeciras, caracterizada por un impacto crónico persistente. En su entorno, existen industrias que, de forma directa o indirecta, emplean diversos metales pesados, considerados, entre otros, como contaminantes prioritarios según la lista aprobada en la decisión nº 2445/2001 del Parlamento Europeo, por la que se modificó la Directiva Marco 60/2000/CE (DOCE, 2000). Estos contaminantes pueden llegar al medio ambiente que rodea la zona y en concreto a los sistemas acuáticos próximos. Por ello, se presenta un estudio integrado del impacto de estas actividades sobre la Bahía de Algeciras, para lo que se propone la evaluación del nivel de contaminación de algunos metales en las aguas, los sedimentos y la biota, tres compartimentos ambientales que son los referenciados en las estrategias de trabajo de la Directiva Marco de Aguas (Directiva 2000/60/CE) para la monitorización de las aguas marinas.

Así, se incluye la cuantificación de los niveles totales y el fraccionamiento de las especies químicas de As, Cr, Ni y Co en las muestras de la Bahía de Algeciras. Para ello, se realizaron campañas de muestreo durante 2 años consecutivos, haciendo coincidir en el tiempo la toma de muestra de aguas, sedimentos y especies de peces, cuya actividad biológica se desarrolle en las zonas cercanas a los sedimentos y en la masa de agua, con objeto de correlacionar los contenidos metálicos en los tres compartimentos ambientales.

Los muestreos se realizaron en las estaciones de invierno y verano, coincidiendo con los ciclos biológicos de las especies a muestrear. Se tomaron las muestras en 4 zonas: una con una posible afección por vertidos urbanos: Isla verde; y otras tres zonas próximas al sector industrial pesado de la comarca: Desembocadura del río Palmones, Desembocadura del río Guadarranque y Puente Mayorga. Asimismo se incluyó un punto de control localizado en la Playa de Getares.

Los trabajos de investigación presentados en este capítulo se engloban dentro del Proyecto de Investigación de Excelencia del Plan Andaluz de Investigación denominado "Evaluación del efecto de la contaminación por actividades antropogénicas crónicas sobre el medio litoral" (PAI 2006: P06-FQM-02075) concedido por la Junta de Andalucía, cuyo objetivo global abarca el estudio del impacto de diversas actividades antropogénicas sobre el medio litoral en una zona de gran actividad del suroeste de la Comunidad Andaluza (la Bahía de Algeciras) mediante la evaluación de 4 grupos de contaminantes prioritarios según la lista OSPAR de sustancias peligrosas: metales pesados y su especiación química (MP); hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), policlorados dibenzo-para-dioxinas (PCDDs) y polibromados difenilesteres (PBDE), en aguas, sedimentos y biota (especies biomonitoras de contaminantes inorgánicos y/o orgánicos).

4.1. Antecedentes y descripción de la zona de estudio

La importancia de monitorizar y evaluar la contaminación metálica en muestras acuáticas es incuestionable dado el efecto nocivo que supone su presencia a determinadas concentraciones sobre la calidad medioambiental y sobre los organismos vivos. De igual forma, la capacidad de algunos metales pesados de presentar el fenómeno de la biomagnificación o bioacumulación, los convierten en sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas en la que se incluyen de forma explícita estos elementos así como algunos de sus compuestos [Coquery y col., 2005].

La directiva Marco de Aguas de la Unión Europea (Directiva 60/2000/CE del Parlamento Europeo y del Consejo sobre Política de Aguas, DOCE nº L327/1, de 22/12/2000) establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas por medio de una estrategia combinada que comporta la formulación de normas armonizadas de calidad del agua y el monitoreo o control de emisiones de los elementos que la definen (parámetros de calidad ecológicos/biológicos, sustancias químicas prioritarias orgánicas/inorgánicas y parámetros físico-químicos). El éxito de la implementación de esta normativa marco depende de la disponibilidad de herramientas analíticas de bajo coste y de la tecnología capaz de producir resultados de calidad [Allan et al., 2006].

Como se ha indicado en el capítulo de introducción de esta tesis, los metales pesados aparecen de forma natural en los ecosistemas acuáticos; sin embargo, altos niveles de los mismos implican una contaminación, generalmente de origen humano. Las descargas urbanas (incluso de aguas tratadas en depuradoras), industriales, agrícolas, etc. contienen cantidades altas de metales pesados en comparación con sus valores naturales. La actividad humana ha contribuido notablemente al aumento de los niveles de metales en las aguas, sedimentos, flora y fauna, tanto marinas como epicontinentales. La presencia de elevadas concentraciones de metales en el medio provoca efectos adversos sobre el medio ambiente y la salud humana. Por todo ello, la contaminación progresiva del medio hídrico por metales pesados y los efectos perjudiciales que ésta produce en la biota han dado lugar a la necesidad de determinar la concentración de metales en diversas muestras acuáticas que conforman estos ecosistemas.

La concentración de metales en la columna de agua es generalmente baja; por el contrario, estos elementos se acumulan en los sedimentos y en los organismos acuáticos, alcanzándose niveles importantes. La movilidad de los metales pesados desde los sedimentos depende en gran medida de sus potenciales redox y modificaciones en el medio pueden producir su resuspensión y disolución. Por tanto, el transporte físico y los procesos físico-químicos determinan conjuntamente la distribución y velocidad de cambio de las concentraciones de las formas químicas de los metales traza en sistemas acuáticos.

Para estudiar la relación existente entre la concentración de metales en los organismos y en el medio que los rodea, se suelen realizar ensayos de toxicidad en el laboratorio y bajo condiciones cuidadosamente controladas, que permiten obtener resultados precisos. Sin embargo, tal y como se indicó en el capítulo de introducción, suelen ser poco representativos de las condiciones reales en las que se encuentran estos organismos en el medio natural, tanto en lo referente a las concentraciones de agentes potencialmente tóxicos presentes en el agua como a su periodo de exposición. Además, de esta forma no se tienen en cuenta las interacciones entre sí de los distintos contaminantes, ni las de éstos con el medio físico y químico. Es por ello que, teniendo en cuenta estas circunstancias, resulta más interesante abordar estudios de contaminación en ecosistemas reales y el efecto que los metales producen en los seres vivos.

La Bahía de Algeciras es, junto con el estuario de Huelva, una de las áreas más industrializadas del sur de España. La Bahía de Algeciras, localizada en el suroeste de la costa mediterránea española, entre 36° 6' 0" y 36° 11' 0" Norte, y 5° 26' 45" y 5° 21' 0" Oeste, está delimitada por Punta del Carnero al oeste (cerca de la ciudad de Algeciras) y Punta Europa al este (en Gibraltar). La bahía tiene unos 10 km de largo por 8 de ancho, lo que se traduce en una superficie de 75 km², con profundidades de hasta 400 m en el centro de la bahía (Figura 4.1).

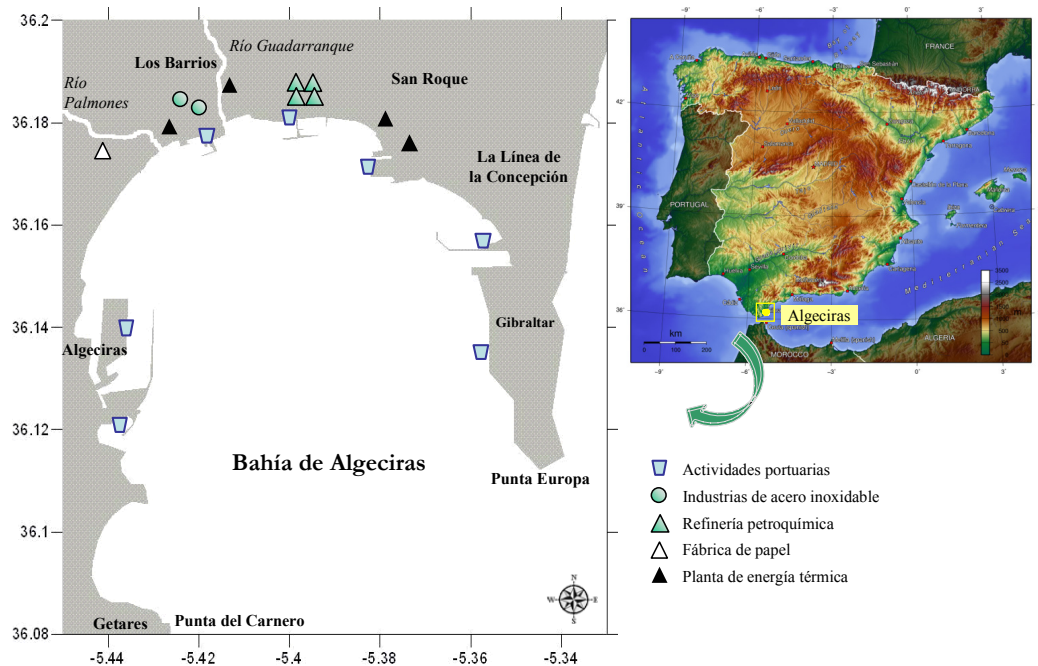


Figura 4.1. Situación geográfica de la zona de estudio

Punto de unión de dos mares y dos continentes, la Bahía de Algeciras se encuentra englobada en el conjunto geológico conocido como Complejo del Campo de Gibraltar, el cual constituye la entidad geológica más característica y ampliamente representada de la provincia de Cádiz.

Este complejo está constituido principalmente por sedimentos arcillosos y areniscos de edad cretácica y terciaria, depositados en ambientes marinos profundos. Se conocen unidades tectónicas comparables en todo el norte de África, lo que significa que los materiales del Campo de Gibraltar se depositaron en una extensa cuenca sedimentaria de la que también formaron parte las cordilleras alpinas norteafricanas [Plan de Calidad Ambiental del Campo de Gibraltar, 2001].

Respecto a su geomorfología, es un espacio donde existe una gran variedad de formas, desde acantilados de muy lenta evolución, hasta los depósitos de arena modelados por la acción de las corrientes de deriva y formaciones dunares de origen eólico, a lo cual se debe añadir la relevancia de su morfología diluvial desarrollada por los depósitos de los ríos en cuyas desembocaduras se encuentran pequeños estuarios y cordones arenosos de infiltración [Plan de Calidad Ambiental del Campo de Gibraltar, 2001].

También hay que destacar la estrecha relación de este espacio con el Parque Natural de los Alcornocales que se extiende por parte de los términos municipales de Algeciras y Los Barrios.

La comarca del Campo de Gibraltar es una de las zonas más industrializadas de la provincia de Cádiz y en ella se sitúa uno de los tejidos productivos más importantes de la Comunidad Autónoma Andaluza. Esta comarca presenta una de las problemáticas ambientales más complejas de toda la Comunidad Autónoma.

Grandes cantidades de contaminantes se vierten habitualmente a la Bahía de Algeciras desde amplios núcleos urbanos, como son la ciudad de Algeciras, La línea de la Concepción y Gibraltar, cuya principal contribución son las aguas urbanas residuales. La bahía también se encuentra rodeada de una extensa área industrializada (una de las mayores en Andalucía) con un número significativo de plantas petroquímicas y refinerías, además de las plantas de fabricación de aceros, papel y centrales de energía térmica [Periáñez, 2012].

Los ríos Guadarranque y Palmones drenan sus aguas a la bahía, que a su vez recibe contaminantes debido al intenso tráfico marítimo que existe en el Puerto de Algeciras, uno de los mayores puertos de España. El agua en esta bahía cuenta con un alto grado de renovación debido a su proximidad al Estrecho de Gibraltar, donde el Mar Mediterráneo y el Océano Atlántico convergen, y a las fuertes corrientes que predominan en esta zona. Estos factores, junto con la profundidad de sus aguas, hacen que los contaminantes se dispersen de forma efectiva, de manera que sus efectos se ven considerablemente reducidos [Morillo y col., 2007; Morillo y Usero, 2008].

La existencia de una industria generadora de un notable volumen de actividad, la integración de importantes núcleos de población en torno a las fuentes de actividades económicas, la importancia a nivel mundial del Puerto Bahía de Algeciras, la estratégica situación geográfica de puente entre continentes y océanos, unida a un entorno natural que conserva numerosos valores ambientales de carácter único, son sólo algunos de los factores que motivan que las relaciones entre el desarrollo económico del Campo de Gibraltar y la preservación del medio ambiente sean complejas.

4.1.1. Clasificación de las aguas de la Bahía de Algeciras

Al objeto de establecer las limitaciones de vertidos contaminantes, los objetivos de calidad de las aguas litorales afectadas directamente por los mismos y el canon de vertidos, las aguas litorales andaluzas fueron clasificadas en base a la normativa aplicable de la Junta de Andalucía: Decreto 204/2005, de 27 de septiembre, publicada en BOJA núm. 208 de 2005, que tiene por objeto la revisión de las declaraciones de zonas sensibles y menos sensibles en las aguas del litoral y de las cuencas hidrográficas intracomunitarias de la

Comunidad Autónoma de Andalucía efectuadas por el Decreto 54/1999, de conformidad con lo dispuesto en el Real Decreto 509/1996 y el Real Decreto-Ley 11/1995. Según el citado texto, se definen dos grupos de ecosistemas acuáticos: zonas sensibles y zonas normales.

Zonas sensibles:

Se consideran como zonas sensibles aquellos medios acuáticos superficiales que teniendo un intercambio de aguas escaso o que recibiendo nutrientes, sean eutróficos o puedan llegar a serlo en un futuro próximo si no se adoptan medidas de protección, así como las aguas dulces de superficie destinadas a la obtención de agua potable, que podrían contener una concentración de nitratos superior a la que establecen las disposiciones vigentes para este tipo de aguas si no se tomasen medidas de protección.

Se entiende por eutrofización el aumento de nutrientes en el agua, especialmente de los compuestos de nitrógeno o de fósforo, que provoca un crecimiento acelerado de algas y especies vegetales superiores, con el resultado de trastornos no deseados en el equilibrio entre organismos presentes en el agua y en la calidad del agua a la que afecta.

Zonas normales:

Se consideran zonas normales aquellos medios acuáticos superficiales no definidos como sensibles.

Según este Decreto, se consideran las aguas de la Bahía de Algeciras como zonas normales.

4.1.2. Estudios previos de contaminación metálica en la Bahía de Algeciras

Desde el punto de vista ambiental, no existen muchos trabajos científicos de la zona que se hayan dedicado a estudiar los niveles de la contaminación metálica en los tres compartimentos ambientales (agua, sedimentos y peces), así como las correlaciones existentes en dichos compartimentos.

Morillo y col., en 2007 estudiaron la movilidad de metales en los sedimentos de la bahía y encontraron altos niveles de Ni y Cr que sobrepasaban los máximos permitidos, de acuerdo con los niveles guías para la protección de la vida acuática [Morillo y col., 2007].

En el mismo año, Morales-Caselles y col., realizaron un estudio comparativo de la calidad de los sedimentos en la Bahía de Algeciras (afectada por contaminación crónica) y en el Parque Nacional de las islas Atlánticas de Galicia (afectada por contaminación aguda tras el naufragio del Prestige en 2002). Observaron que el Ni y el Hg superaban los niveles guías para la protección de la vida acuática en la Bahía de Algeciras, mientras que en

Galicia fue el Cu el que sobrepasó ese estándar. Sin embargo, estudios anteriores al episodio del Prestige habían demostrado que existían otras fuentes de este metal en la zona, por lo que dicha contaminación con Cu podría no estar relacionada con el naufragio [Morales-Caselles y col., 2007]. Posteriormente en 2008, Morales-Caselles y col., demostraron que el impacto asociado a episodios de contaminación crónicos eran significativamente más peligrosos y contaminantes que aquellos que son agudos [Morales-Caselles y col., 2008].

También en 2007, Cesar y col., compararon sedimentos de diferentes zonas del sur de España y de Brasil. De nuevo, el Ni, junto con el Cu y el Zn fueron los metales que sobrepasaron los límites permitidos en la Bahía de Algeciras. En general, se encontraron valores más altos de los metales estudiados (Cd, Co, Cu, Ni, Pb, V y Zn) en la Bahía de Algeciras que en los estuarios de Santos y São Vicente, en Brasil [Cesar y col., 2007].

Asimismo, otros autores han estudiado la contaminación metálica en la bahía utilizando crustáceos como especies biomonitoras, que se definen como aquellas especies que fácilmente acumulan metales pesados en sus tejidos, pueden ser analizadas para evaluar la biodisponibilidad de dichos contaminantes en los ecosistemas y permiten estimar extrapolaciones de comportamiento a otras especies [Morillo y Usero, 2008, Guerra-García y col., 2009; Guerra-García y col., 2010].

La Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía (CMAJA), junto con varios grupos de investigación de la Universidad de Cádiz (UCA) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), impulsó en 2002 el Plan de calidad ambiental del Campo de Gibraltar (PCACG) con la finalidad de identificar los principales problemas ambientales, realizar un diagnóstico de la situación y proponer y afrontar las respuestas más adecuadas para solucionarlos. Dentro de este plan de calidad ambiental, se estudió no solo la concentración de metales pesados en aguas y sedimentos, sino también otros parámetros de calidad biológica (fitoplancton, macrófitos e invertebrados), parámetros de contaminación microbiológica (coliformes y estreptococos fecales) e indicadores físico-químicos (como amonio, fosfatos, nitratos, materia orgánica,...). En dicho estudio, se encontró que no existía contaminación metálica en las aguas de la bahía, pero sí en los sedimentos recogidos próximos a la factoría Acerinox, destacando altos valores de cromo, níquel y cobre [Plan de Calidad Ambiental del Campo de Gibraltar, 2006].

Puede decirse que son pocos los estudios realizados sobre la contaminación metálica en la Bahía de Algeciras que estén relacionados con las aguas y los sedimentos, pero se dispone de muy poca información sobre el contenido metálico en peces, sobre la especiación en muestras acuáticas y en sedimentos, así como la correlación entre los tres compartimentos.

Por ello, en esta Tesis se aborda de forma integrada (agua, sedimentos y peces) la evaluación de la contaminación metálica de la Bahía de Algeciras, realizando el estudio de la especiación metálica en aguas y sedimentos, con objeto de definir su potencial disponibilidad hacia la biota.

4.2. Metales estudiados en la Bahía de Algeciras

El agua de mar contiene de forma natural bajas concentraciones de metales pesados, que no sólo no resultan perjudiciales para el ecosistema, sino que son necesarios para el desarrollo de determinados organismos vivos. El problema surge cuando se produce un aumento en su concentración. Estos elementos, que resultan beneficiosos o incluso imprescindibles, se convierten en sustancias tóxicas para los organismos marinos e incluso pueden acumularse en la cadena trófica, de modo que pueden convertirse en sustancias tóxicas para el hombre.

Las aguas residuales contienen una cantidad variable en elementos de este tipo. La presencia de estos metales estará condicionada al tipo de industria y de actividades que se produzcan en los municipios de alrededor.

La lista de metales y metaloides incluidos en todas las normativas de calidad de aguas y vertidos al litoral, incluyen un total de 20 elementos. La normativa andaluza (Orden de 14 de febrero de 1997, publicada en BOJA núm. 27 de 1997) considera necesario el control ambiental de 11 metales: arsénico, cadmio, cobre, cromo (total), cromo (VI), estaño, mercurio, níquel, plomo, selenio, titanio y cinc.

Es por ello que en este trabajo se decidió evaluar y biomonitorizar los metales arsénico, níquel y cromo, además del cobalto que también es indicador de aguas contaminadas por vertidos industriales, como parte del proyecto de investigación realizado en el grupo de investigación y mencionado al comienzo de este capítulo.

4.2.1. Arsénico

El metaloide más importante como contaminante del agua es el arsénico, elemento tóxico que ha sido el “villano” químico de más de un complot de asesinatos [Frankenberger, 2001].

El arsénico es quebradizo, con estructura metálica cristalina, que presenta tres formas alotrópicas de colores amarillo, negro y gris. El arsénico se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza pudiendo encontrarse cantidades detectables tanto en suelos,

como en aguas superficiales, aguas subterráneas y otros medios. Se encuentra en la corteza de la Tierra en un nivel medio de 2-5 mg/kg [Manahan, 2010]. Es un constituyente natural de los minerales de plomo, cinc, oro y cobre. Fenómenos naturales tales como la meteorización, la actividad biológica y la actividad volcánica junto con las aportaciones antropogénicas son las responsables de la emisión de arsénico a la atmósfera, desde donde se redistribuye a la superficie de la tierra mediante la lluvia y el viento [Cullen y Reimer, 1989; Bissen y Frimmel, 2003; Oremland y Stolz, 2003]. Algunos plaguicidas que se usaban anteriormente, particularmente antes de la Segunda Guerra Mundial, contienen compuestos de arsénico muy tóxicos. En aguas naturales, el arsénico se encuentra a nivel de trazas. La concentración de este metal en aguas costeras, bahías y estuarios puede oscilar entre 1,0 – 1,04 µg/L [Crompton, 2007].

La movilidad y biodisponibilidad del arsénico depende principalmente de la especie química de arsénico presente, del pH del suelo o de las aguas subterráneas, de la presencia de óxidos de manganeso e hierro y arcillas, del potencial redox y de la presencia de otros iones competidores. Las especies más abundantes de arsénico en suelos y aguas son el As(III) y el As(V) [Oremland y Stolz, 2003; Bradl y col., 2005].

Tanto As(III) como As(V) en aguas naturales normalmente se enlazan a oxígeno para formar especies inorgánicas de arsenito (As(III) inorgánico) y arseniato (As(V) inorgánico), respectivamente. Dependiendo del pH, As(III) puede existir como H_3AsO_3 , H_2AsO_3^- , HAsO_3^{2-} y/o AsO_3^{3-} . En aguas anóxicas y ricas en sulfuros, el As(III) puede formar tioarsenitos. As(V) ocurre usualmente como H_3AsO_4 , H_2AsO_4^- , y /o AsO_4^{3-} dependiendo del pH. En agua de mar oxigenada, el As se encuentra predominantemente como As(V) en forma de HAsO_4^{2-} . Además, pueden existir tioarseniatos en aguas anóxicas con contenido alto de sulfuros [Henke, 2009; Gibbon-Walsh y col., 2012].

En aguas costeras, bahías y estuarios, As(V) inorgánico es la especie predominante. Sin embargo, las aguas estuáricas pueden contener concentraciones importantes de As(III) cuando se encuentran en condiciones anóxicas o con alta actividad biológica. Por otra parte, altas actividades biológicas también pueden ser responsables de la formación de especies organoarsénicas (como el ácido monometilarsónico o el dimetilarsónico). En algunas zonas, estas especies pueden llegar a representar un 25% del total de arsénico en aguas costeras marinas [Henke, 2009].

De todas las especies de As, la que presenta mayor toxicidad es el As(III). Esta especie es 60 veces más tóxica que el As(V). Además, los compuestos inorgánicos de arsénico son 100 veces más tóxicos que los orgánicos [Jain y Ali., 2000].

El arsénico trivalente se absorbe más rápidamente que el arsénico pentavalente en los sistemas biológicos, aunque ambos estados de oxidación inhiben los procesos energéticos vinculados a las funciones de la mitocondria. Los compuestos de As(III) tienen una alta

afinidad por los grupos sulfhidrilo de las proteínas provocando la desactivación de las enzimas. Por su parte los compuestos de As(V) compiten con los fosfatos en las reacciones celulares pudiendo desacoplar la fosforilación oxidativa, de modo que no se conserven los enlaces trifosfatos de alta energía de la adenosina. También se piensa que los compuestos orgánicos del As ejercen efectos tóxicos en los organismos vivos a través de su metabolización a la especie de trióxido de arsénico.

En los invertebrados acuáticos, tales como mejillones, crustáceos y moluscos, se ha demostrado que la absorción de arsénico es directamente proporcional a la concentración de As en el medio; por el contrario no parece que el arsénico se bioacumule en los peces. Los peces son capaces de retener más del 99% del arsénico ingerido en forma orgánica. En general, el arsénico no se biomagnifica a través de la cadena alimenticia y los factores de bioconcentración observados para los organismos acuáticos son relativamente bajos, excepto en el caso de las algas [Bradl y col, 2005]. Poco se sabe acerca de los mecanismos de toxicidad del arsénico a niveles subletales en peces, sin embargo se ha observado que bajas concentraciones de As afectan a procesos fisiológicos que están involucrados en los procesos que regulan el estrés. Así, se observa que cuando aumenta la concentración de especies nocivas de arsénico en los peces ocurre un crecimiento anormal, se reduce la capacidad de aclimatación a los cambios en la temperatura y salinidad y se observan cambios en la reproducción [Bears y col, 2006]. Aunque se ha observado que el arsénico se acumula primero en la retina, el hígado y la piel de los peces, puede interferir con el sistema inmune suprimiendo la producción de anticuerpos y citoquinas, haciéndolos más susceptibles a las infecciones [Datta y col, 2009].

El arsénico en humanos puede causar intoxicación aguda y crónica. Los síntomas de una intoxicación crónica de arsénico son la debilidad, la pérdida de reflejos, gastritis, colitis, anorexia, pérdida de peso y de cabello. Una exposición prolongada a través de la comida o el aire puede dar lugar a hiperqueratosis, hiperpigmentación, enfermedades cardiovasculares, alteraciones en la periferia vascular y en el sistema nervioso, trastornos circulatorios, uñas quebradizas, eccemas y daños en hígado y riñón. El arsénico se acumula en el cabello, la piel, las uñas y los huesos. Una intoxicación aguda por arsénico puede causar vómitos, sequedad en la boca y la garganta, calambres musculares, dolor abdominal, cólico, hormigueo en pies y manos, piel húmeda y fría, alucinaciones, delirios y diarrea. La muerte ocurre debido a un fallo renal antes de 24 horas, o en los días siguientes debido a fallos multiorgánicos o por ataque al corazón. El arsénico es dañino a nivel genético ya que inhibe los procesos de reparación del ADN. La absorción de arsénico por vías aéreas causa cáncer de pulmón. La ingesta por vía oral provoca cáncer de vejiga, insuficiencia renal, cáncer de hígado y cáncer de piel [Bissen y Frimmel, 2003].

El cuerpo humano puede desintoxicar una cierta cantidad de compuestos inorgánicos de As(III) y As(V) a través de la metilación. Estos compuestos metilados se excretan por la

orina después de tres a cuatro días. La capacidad de metilación de los compuestos de arsénico es limitada de 400 a 500 mg por día. Aunque la sensibilidad al arsénico es diferente para cada individuo, los seres humanos que no están acostumbrados al consumo de arsénico pueden morir con una absorción de arsénico entre 0,1 y 0,3 g por día.

4.2.2. Níquel

El níquel y sus compuestos se liberan a la atmósfera a través de fuentes naturales y antropogénicas. Aunque el Ni es un elemento esencial en las plantas así como en la biota, existe una gran preocupación por su toxicidad y su carencia. Muchos estudios han concluido que existe un aumento significativo en las concentraciones de este metal pesado en suelos agrícolas y en bosques, así como en los sedimentos de aguas subterráneas y marinas desde el siglo pasado [Pacyna E.G. y Pacyna, J.M., 2001].

También se observa un aumento en las áreas alejadas de las fuentes antropogénicas debido al transporte atmosférico de largo alcance, así se han detectado concentraciones elevadas de este metal en la región ártica, en las zonas finlandesa, noruega y lapona [Lindroos y col., 1996; Pacyna y Ottar, 1985].

Nriagu y Pacyna [Nriagu y Pacyna, 1988] dan una valoración de unas 24000-87000 toneladas de emisiones mundiales de Ni a la atmósfera en 1983, y unas descargas en los suelos a través del polvo radiactivo, basuras, fertilizantes, lodo de aguas residuales, partículas atmosféricas, etc., de unas 106000 a 544000 toneladas por año. En este contexto, parece indicado que se tenga a este metal en consideración en los estudios ambientales.

El níquel es abundante y más de un millón de toneladas son producidas anualmente en todo el mundo por operaciones de minería, laminado, fundición y refinación. No obstante, es también uno de los materiales más reciclados en la actual economía global. Si añadimos a esto el hecho de que la mayoría de los productos que contienen níquel poseen una larga vida útil, un promedio de más de 25 años, se tiene una sustancia con una gran contribución al desarrollo sostenible [ENIA, 2006].

Aproximadamente el 65% del níquel consumido se emplea en la fabricación de acero inoxidable austenítico y otro 12% en superaleaciones de níquel. El restante 23% se reparte entre otras aleaciones, baterías recargables, catálisis, acuñación de moneda, recubrimientos metálicos y fundición [Níquel, 2006].

Las fuentes importantes de Ni incluyen la minería, la producción de acero y aleaciones, electroplateado, transportes, industrias químicas, equipamientos eléctricos y construcción. [WHO, 2000]. Sin embargo, la fuente antropogénica principal de Ni es la quema de combustibles fósiles, emitiendo 86110 toneladas de Ni en 1995, que es más de dos veces

las emisiones que se produjeron en 1983 para este metal (40833 toneladas) [Pacyna E.G. y Pacyna, J.M., 2001].

En aguas naturales, el níquel se encuentra a nivel de trazas. La concentración de níquel en mar abierto se encuentra en el rango 0,15 – 0,93 µg/L, mientras que en aguas costeras, bahías y estuarios puede oscilar entre 0,2 – 5,33 µg/L [Crompton, 2007]. El níquel en agua de mar se encuentra como Ni(II) y su forma mayoritaria es como catión hidratado. Además, puede encontrarse como NiHCO_3^+ , NiCl^+ si el valor de pH es próximo a 7. Para valores de pH cercanos a 10, comienzan a formarse las especies NiOH^+ , Ni(OH)_2 , y NiCO_3 [vanLoon y Duffy, 2011]. Normalmente no forma especies organometálicas en aguas oceánicas [Ure y Davidson, 2002].

El efecto adverso más común de exposición al níquel en seres humanos es una reacción alérgica. Aproximadamente el 2% de hombres y el 11% de mujeres de la población son sensibles al níquel. Algunas personas sensibilizadas reaccionan cuando ingieren níquel en los alimentos o el agua, o cuando respiran polvo que contiene níquel. Además, se ha confirmado que en personas que respiraron polvo que contenía altos niveles de compuestos de níquel durante el trabajo en refinerías de níquel o en plantas de procesamiento de níquel, se observó un aumento de cáncer de pulmón y de los senos nasales [WHO, 2000].

El Departamento de Salud y Servicios Humanos (DHHS) ha determinado que es razonable predecir que el níquel metálico es carcinogénico y que los compuestos de níquel son sustancias reconocidas como carcinogénicas. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha determinado igualmente que algunos compuestos de níquel y posiblemente el níquel metálico son carcinogénicos en seres humanos. De forma similar la EPA ha determinado los mismos efectos para los polvos de refinerías de níquel y el sulfuro de este metal.

El níquel es también hepatotóxico, y los estudios demuestran que el cinc puede prevenir la toxicidad del níquel inducida y mantener los niveles normales y la función de las enzimas del hígado [Sidhu y col., 2004]. El níquel, como otros metales, puede inducir la peroxidación lipídica y puede agotar el glutatión, muy probablemente a través de mecanismos de estrés oxidativos [Kasprzak y col., 2003; Valko y col., 2005].

4.2.3. Cobalto

El cobalto es un sólido de color gris plateado a temperatura ambiente. Puede encontrarse en diversos medios, como aire, agua superficial, agua subterránea, filtraciones de vertederos de desechos peligrosos, suelos y sedimentos. Las fuentes de exposición al cobalto son tanto naturales como antropogénicas. Las fuentes naturales incluyen el polvo

arrastrado por el viento, el agua marina pulverizada, los volcanes, los incendios forestales y las emisiones biogénicas continentales y marinas. Entre las fuentes antropogénicas cabe mencionar la quema de combustibles fósiles, los fangos de alcantarillado, los fertilizantes fosfatados, la extracción y fusión de menas de cobalto, la preparación de aleaciones de cobalto y las industrias que utilizan o elaboran compuestos de cobalto. El cobalto metálico se utiliza junto con hierro y níquel para formar aceros especiales con propiedades magnéticas. También se utiliza junto con cromo y wolframio en aceros Estelite, que se utilizan para fabricar herramientas de corte de alta velocidad [Cobalt Development Institute, 2004]. Recientemente se ha descubierto un nuevo método para la conversión directa de calor en electricidad mediante el uso de un acero multiferroico que contiene cobalto: $\text{Ni}_{45}\text{Co}_5\text{Mn}_{40}\text{Sn}_{10}$ [Srivastava y col., 2011]. Asimismo, se utiliza como pigmento en vidrios, cerámicas y pinturas, y como catalizador en industrias de petróleo y en baterías.

El cobalto y sus compuestos inorgánicos no son volátiles y se liberan a la atmósfera como partículas. El cobalto antropogénico procedente de la combustión se encuentra fundamentalmente en forma de óxidos. Los sulfuros y arseniuros se liberan a la atmósfera a partir de procesos de extracción y refinado.

Las concentraciones de cobalto medidas en la atmósfera son de alrededor de 1 ng/m^3 o menos en zonas que carecen de fuentes de este elemento y en general son de menos de 10 ng/m^3 en las zonas que sí las tienen, aunque también se han detectado concentraciones más altas en estas últimas. Las concentraciones de cobalto en las aguas superficiales y freáticas son bajas, inferiores a $1 \text{ } \mu\text{g/L}$ en zonas vírgenes y de $1\text{--}10 \text{ } \mu\text{g/L}$ en zonas pobladas, pudiendo alcanzar valores mucho más elevados en zonas mineras y agrícolas, de hasta varios cientos de mg por litro. La concentración de este metal en mar abierto se encuentra en el rango $0,003\text{--}0,16 \text{ } \mu\text{g/L}$, mientras que en aguas costeras, bahías y estuarios puede oscilar entre $0,01\text{--}0,25 \text{ } \mu\text{g/L}$ [Crompton, 2007]. Al igual que el Ni, el Co en agua de mar se encuentra como Co(II) y su forma mayoritaria es como catión hidratado. Además, puede encontrarse como CoCO_3 cuando el valor de pH es próximo a 7. Para valores de pH cercanos a 10, predominan las especies Co_3O_4 y CoCO_3 [vanLoon y Duffy, 2011]. Normalmente no forma especies organometálicas en aguas oceánicas [Ure y Davidson, 2002].

La inhalación de partículas de cobalto da lugar a su deposición en las vías respiratorias, donde pueden quedar retenidas o pasar a la sangre tras su disolución, o bien transferirse al tracto gastrointestinal por acción mucociliar y deglución. Se absorbe alrededor del 50% del cobalto que entra en el sistema gastrointestinal. La absorción es mayor en las personas con deficiencia de hierro. Las formas solubles en agua se absorben mejor que las insolubles. El cobalto es esencial puesto que es el ión central en la molécula de la vitamina B12; por consiguiente, se encuentra en la mayoría de los tejidos. Su acumulación total en el organismo se estima en $1,1\text{--}1,5 \text{ mg}$, con $0,11 \text{ mg}$ en el hígado. Se han observado

concentraciones más altas de cobalto en los pulmones tras la exposición por inhalación. No hay estudios que describan su distribución en las personas tras la ingestión, pero diversos estudios en animales indican que se retiene fundamentalmente en el hígado. En un estudio de exposición humana controlada a aerosoles, el 40% de la acumulación inicial de óxido de cobalto en los pulmones se retuvo seis meses después de la exposición. La excreción urinaria aumenta con el tiempo tras la exposición por inhalación. El tamaño de las partículas influye en la eliminación del cobalto inhalado, puesto que cuanto más grandes son las partículas más cobalto pasa mecánicamente al tracto gastrointestinal. La eliminación fecal es la principal vía de excreción en las personas tras la exposición oral [Kim y col., 2006].

Se ha comprobado que el cobalto tiene efectos en la reproducción y el desarrollo de los animales, produciendo degeneración y atrofia testicular en machos. Las ratas preñadas expuestas a dosis de cloruro de cobalto produjeron crías recién nacidas con crecimiento retardado y disminución de la supervivencia, pero no se observó ningún efecto teratogénico [Kim y col., 2006].

La inhalación y la exposición cutánea al cobalto en humanos pueden dar lugar a sensibilización. En trabajadores expuestos a diversas formas de cobalto se ha descrito asma bronquial. Las personas que ingirieron cloruro de cobalto en concentraciones de 150 mg/día durante 22 días sufrieron policitemia y un aumento de la hemoglobina. También hay estudios en los que se ha descrito cardiomiopatía en personas que habían consumido grandes cantidades de cerveza que contenía sulfato de cobalto [Kim y col., 2006].

4.2.4. Cromo

El cromo en aguas proviene de fuentes naturales, como la erosión o el desgaste de constituyentes rocosos, precipitaciones y deposición seca procedente de la atmósfera. En aguas naturales, el cromo se encuentra a nivel de trazas. La concentración de cromo en mar abierto se encuentra en el rango 0,005 – 1,26 µg/L, mientras que en aguas costeras, bahías y estuarios puede oscilar entre 0,095 – 3,3 µg/L [Crompton, 2007]. Sin embargo, las concentraciones de este metal en áreas contaminadas pueden llegar a ser un poco más altas, debido a las descargas de aguas residuales procedentes de industrias metalúrgicas, electroplateado, curtido de cueros, torres de refrigeración, conservación de maderas, industria de tintes, pinturas y papel [Khezami y Capart, 2005].

Las especies de cromo presentes en los efluentes dependen del proceso industrial en el que se genere este metal. El cromo es un elemento que presenta un rango de estados de oxidación que varía entre cromo divalente y cromo hexavalente, aunque las formas mayoritarias en aguas naturales son la trivalente y hexavalente [Sander y col., 2003]. El

cromo trivalente es la forma más común que se puede encontrar en la naturaleza y, probablemente, es la forma en que se encuentra el cromo en el material biológico. No hay evidencia de la conversión del cromo hexavalente a trivalente en los sistemas biológicos, sin embargo, el cromo hexavalente es capaz de cruzar las membranas celulares y luego ser reducido a cromo trivalente [del Ramo y col., 1993].

El Cr(VI) es muy soluble en agua y se encuentra en las aguas naturales formando compuestos estables tales como CrO_4^{2-} , HCrO_4^- o $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$, dependiendo del pH. Tiene muy poca tendencia a formar complejos con ligandos orgánicos o inorgánicos, lo que le permite atravesar las membranas celulares. El Cr(III), sin embargo, presenta reacciones más complicadas. Puede encontrarse en forma hidrolizada como $\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{OH}^{2+}$ y complejoado, además de encontrarse también adsorbido sobre materia coloidal. En presencia de ligandos orgánicos, el Cr(III) tiene tendencia a formar complejos, que presentan cinéticas muy lentas [Li y Xue, 2001; Sander y col., 2003; Pyrzynska, 2012]. Los compuestos de Cr(III) en el agua tienen tendencia a precipitar desde valores de pH cercano a 4,5. La precipitación y la adsorción del Cr en sedimentos están contraladas por una gran variedad de factores, como el potencial redox, el estado de oxidación, el pH, los minerales existentes, agentes complejantes, etc. Estos factores controlan los procesos de partición entre el sedimento y el medio acuático. Las especies de Cr hexavalentes son especialmente adsorbidas por óxidos de hierro, Al_2O_3 , caolinita y montmorillonita. Las especies de Cr trivalente se adsorben rápida y específicamente a óxidos de hierro y manganeso y a minerales [Bradl y col., 2005].

El cromo, a diferencia del cadmio, mercurio y plomo, se considera un metal esencial. El Cr(III) es un elemento traza esencial para el metabolismo de los mamíferos. Además, se considera un factor importante en la tolerancia a la glucosa y se usa como control en ciertos casos de diabetes. Se ha encontrado que reduce los niveles de colesterol en sangre puesto que es capaz de disminuir la concentración en sangre de las lipoproteínas de baja densidad (LDL). En contraposición al Cr(III), los compuestos de Cr(VI) son tóxicos para los organismos dada su alta movilidad y solubilidad en agua [Mohana y Pittman Jr., 2006].

Los datos disponibles en organismos acuáticos muestran claramente que el Cr(VI) es más tóxico en aguas dulces y blandas, y en general los organismos más jóvenes son más sensibles. También se ha comprobado que las 96 horas de exposición utilizadas en la mayoría de las pruebas de toxicidad son insuficientes para encontrar patrones estables de mortalidad. Los organismos más sensibles son crustáceos y rotíferos de agua dulce y los crustáceos marinos. También se ha comprobado en peces de agua dulce un incremento de la toxicidad en aguas con valores bajos de pH. En peces marinos se produce un incremento de la toxicidad del cromo hexavalente con la temperatura [del Ramo y col., 1993].

La exposición aguda a Cr(VI) en humanos causa náuseas, diarrea, daños en el hígado y riñones, dermatitis, hemorragias internas y problemas respiratorios [Mohan y col., 2006].

La inhalación puede causar toxicidad aguda, irritación y úlceras en las fosas nasales y problemas respiratorios (asma) [Mohan y col., 2005; Mohan y col., 2006; Kimbrough y col., 1999]. Su ingestión puede afectar a la función hepática y renal. El contacto con la piel puede resultar en envenenamiento y causar quemaduras severas. Si no se trata con rapidez, puede llegar a producir úlceras y dermatitis alérgica crónica.

4.3. Toma de muestra

Al proceso de captación, conservación, transporte, manipulación y etiquetado de la muestra, se le denomina toma de muestra.

La toma de muestra o muestreo de una zona potencialmente contaminada por sustancias tanto orgánicas como inorgánicas tiene como objetivo la obtención de información sobre la concentración de dichos compuestos, de manera que pueda establecerse una comparación con los niveles de referencia propuestos para la protección de la salud humana y los ecosistemas.

La importancia del muestreo radica en que la información sobre sustancias contaminantes ha de ser significativa y fiable, de manera que la toma de decisiones sobre el lugar potencialmente contaminado sea adecuada a su particular problemática, referida principalmente a los riesgos que existan para la salud humana y la protección de los ecosistemas.

Esta recogida de muestras debe realizarse atendiendo a una serie de pautas. Es imprescindible una manipulación correcta de la muestra para evitar que los valores de los parámetros determinados en los análisis difieran de los del sistema original y conducir con ello a resultados irreales sobre el tipo y cantidad de los contaminantes presentes, es decir, a un conocimiento falseado de dicho sistema y sus condiciones. Por ello, es necesario que el procedimiento de toma de muestras permita la obtención de una serie de muestras representativas del problema analítico planteado, de forma que el conjunto de éstas sean representativas de la población estudiada.

La caracterización de un sistema hídrico supone la identificación de los contaminantes presentes en él mismo y su cuantificación. Para ello, normalmente no se analiza el total del sistema estudiado sino un volumen finito del mismo que se denomina muestra. Una muestra debe cumplir las siguientes condiciones [González Benito y col., 2002]:

- Ser representativa del sistema en el momento del muestreo.
- Tener un volumen suficientemente pequeño como para facilitar su transporte y manipulación sin que deje de representar adecuadamente al material de donde procede.

Este objetivo implica que la concentración relativa de todos los componentes será la misma en las muestras que en la población objetivo y éstas serán tratadas de tal forma que no se produzcan alteraciones significativas en su composición antes de que se realicen las pruebas correspondientes.

- Preservar los valores del parámetro o parámetros a determinar hasta el momento de su análisis.
- Poseer una correcta identificación espacial, temporal y de manipulación.

Teniendo en cuenta estos aspectos, se detalla a continuación la metodología de toma de muestra empleada para cada tipo de muestra a estudiar:

Las muestras de aguas y sedimentos fueron recogidas desde el barco de la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, llamado *Isla de Tarifa* (Figura 4.2).

Las muestras biológicas fueron capturadas al azar desde un barco de pesca particular contratado para este fin, empleándose las técnicas de arrastre y marisqueo.



Figura 4.2. Embarcación de la Junta de Andalucía empleada en las campañas de muestreo

4.3.1. Muestras de agua

La toma de muestras de agua (Figura 4.3) se realizó en continuo, empleando un tubo de teflón (6406-66 de Cole-Parmer Instrument Co. Illinois U.S.A) acoplado a una bomba peristáltica portátil (MasterFlex E/S portable sampler nº 7571-05, Cole-Parmer Instrument Co., Illinois U.S.A., con cabezal MasterFlex 7518-02), siguiendo el protocolo *manos limpias-manos sucias*, anteriormente explicado en el Capítulo 2.

En cada punto de muestreo todo el sistema de bombeo se enjuagó durante unos minutos con la propia agua antes de tomar la muestra definitiva. Las muestras de agua que así lo precisaron fueron filtradas *in situ* a través de cartuchos de filtración con filtros de membrana de 0,45 micras de tamaño de poro (Whatman groundwater filter capsule, 0,45 μm 29705-92, Cole-Parmer Instrument Co. Illinois U.S.A.), conectados en línea con la bomba y el recipiente recolector. El agua se depositó en botellas de polietileno de baja densidad, que fueron cerradas e introducidas en dos bolsas de plástico de cierre hermético. Las botellas se conservaron en neveras de plástico refrigeradas con bloques de hielo hasta su llegada al laboratorio. El protocolo para la toma de muestras de agua vino determinado por el esquema de especiación que se iba a aplicar en el análisis de los metales objetos de estudio en este trabajo. En cada punto de muestreo se tomaron las siguientes muestras:

- 500 mL de agua sin filtrar a la que se añadió tras la llegada al laboratorio 1 mL de HNO_3 (calidad Suprapur, Merck (Alemania)) de modo que la concentración ácida fuera de 2 mL/L. La muestra se dejó aproximadamente dos semanas a temperatura ambiente para que el ácido pudiera lixiviar los metales que pudieran haberse adsorbido en las paredes del recipiente de plástico durante el transporte. Posteriormente se congeló a -20°C .
- 500 mL de agua filtrada *in situ* a la que se adicionó 1 mL de HNO_3 (calidad Suprapur, Merck (Alemania)) a la llegada al laboratorio, de modo que la concentración ácida fue igualmente de 2 mL/L. La muestra también se dejó aproximadamente dos semanas a temperatura ambiente, como en el caso anterior. Posteriormente fue congelada a -20°C .
- 500 mL de agua filtrada a la que no se adicionó ningún reactivo y que fue congelada inmediatamente tras la llegada al laboratorio a -20°C .
- 500 mL de agua sin filtrar a la que se añadió 1 mL de HCl (calidad Suprapur, Merck (Alemania)) a la llegada al laboratorio y se congeló.
- 500 mL de agua filtrada *in situ* a la que se añadió 1 mL de HCl (calidad Suprapur, Merck (Alemania)) a la llegada al laboratorio y fue congelada hasta su análisis.
- 500 mL de agua sin filtrar, que fueron utilizados para el cálculo de la densidad del agua por pesada y para evaluar la materia suspendida de las muestras. Para el cálculo de la densidad se emplearon matraces de 10 mL previamente secos y tarados. Para la materia suspendida se utilizaron dos porciones de aproximadamente unos 100 mL de agua que

fueron filtrados con bomba de vacío, empleando filtros de nylon de 0,45 μm previamente lavados, secados y tarados.

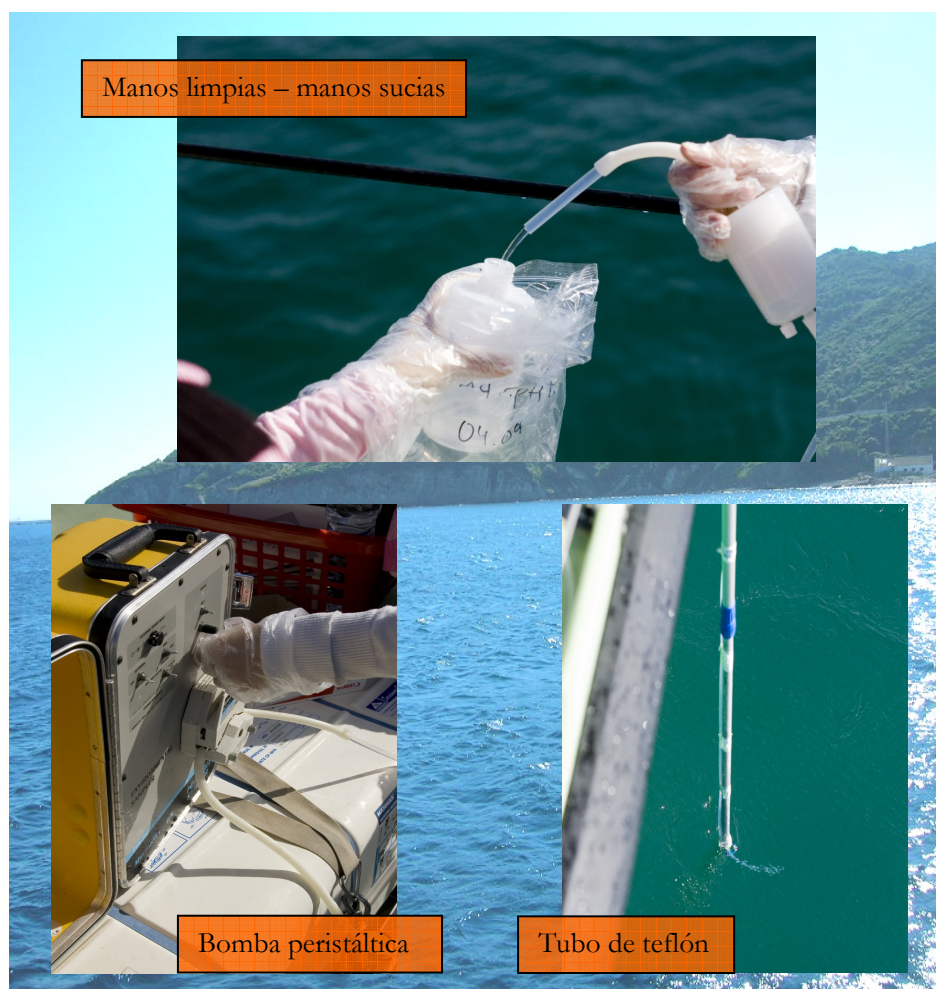


Figura 4.3. Procedimiento de toma de muestra de agua

4.3.2. Muestras de sedimento

Las muestras de sedimentos se tomaron con ayuda de una draga tipo Eckman-Birge y se depositaron dentro de dos bolsas de plástico de cierre hermético. Las muestras de sedimento, al igual que las muestras de agua, se conservaron en neveras de plástico refrigeradas con bloques de hielo hasta su llegada al laboratorio, momento en el que se

congelaron a -20°C hasta que fueron pretratadas y analizadas siguiendo el protocolo de análisis total y especiación.

En la Figura 4.4 se muestra el proceso de toma de muestra de sedimentos.

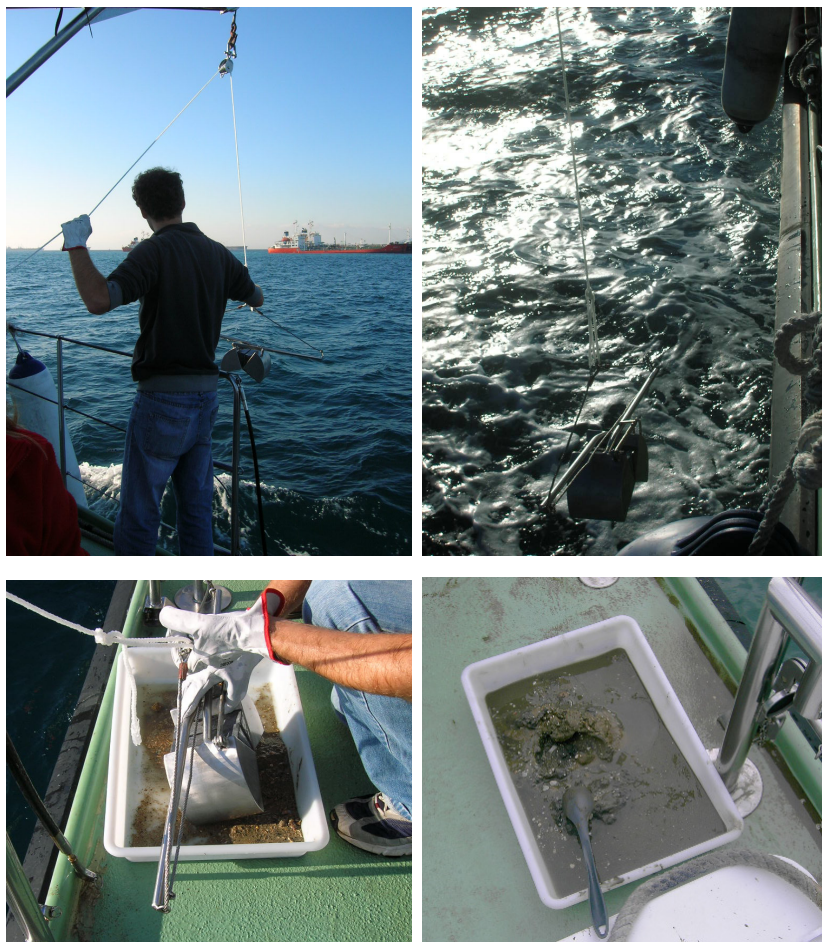


Figura 4.4. Procedimiento de toma de muestra de sedimentos

4.3.3. Muestras de peces

Las muestras biológicas fueron capturadas desde un barco de pesca particular contratado para este fin, empleándose redes o trasmallo. Los peces se mantuvieron con

vida hasta que se diseccionaron en la misma área de captura, y se extrajeron los tejidos objeto de estudio: branquias, músculo e hígado (Figura 4.5). Las muestras se conservaron refrigeradas en nitrógeno líquido hasta su llegada al laboratorio, en donde fueron conservadas a -80°C .



Figura 4.5. Toma de muestra de peces

4.4. Protocolos de limpieza

Son muchas las dificultades que se presentan a la hora de estudiar la distribución y el comportamiento de elementos traza, en concreto los metales pesados, en los ecosistemas acuáticos dada la baja concentración que puede darse para algunos metales y dada la complejidad que pueden presentar algunas matrices. Cuando se trata en concreto de estudios de especiación de metales pesados en aguas, donde los niveles metálicos son menores que en sedimentos y biota, es necesario tomar singulares precauciones desde el punto de vista analítico para alcanzar resultados seguros, fiables y exactos, pues en este

caso las concentraciones metálicas suelen ser muy bajas. Es por ello que se ha de prestar especial atención en evitar la contaminación de la muestra ambiental en cada una de las etapas experimentales que componen el análisis. Estas etapas comprenden la toma de muestra, el almacenamiento de la misma, la realización de una etapa de preconcentración en algunos casos y la determinación analítica final de los elementos de interés. Todos estos pasos implican una manipulación de la muestra que puede originar cambios en su composición, que suelen ser por lo general, debidos a problemas de contaminación. Por ello, hace algunas décadas se introdujeron técnicas de limpieza durante el muestreo y el tratamiento de las muestras. Patterson y Settle (1976) se percataron de que las medidas de las concentraciones ambientales de plomo eran con frecuencia erróneas debido a la contaminación de las muestras y fueron los pioneros en desarrollar los primeros protocolos de limpieza para el muestreo y manipulación de las muestras en el análisis elemental de matrices ambientales.

Así por ejemplo, la introducción de este tipo de técnicas limpias, así como el desarrollo experimentado por las técnicas analíticas instrumentales han permitido disminuir los límites de detección demostrando que las concentraciones en aguas naturales no contaminadas eran entre 10 y 1000 veces inferiores a las que habían sido determinadas con anterioridad [Creasey y Flegal, 1999].

Por estas razones, durante toda la fase experimental se aplicaron condiciones de limpieza para análisis de metales en muestras de sedimento y tejidos biológicos y condiciones de ultralimpieza para el análisis de las aguas, tales como la utilización de dobles guantes de plástico para el manejo del material y atmósferas limpias por medio de campanas de flujo laminar Clase 100 (Crumair 9005-FL, con filtro absoluto HEPA, Cruma, España) durante la manipulación de las muestras.

A continuación se detalla el procedimiento general de limpieza de material, así como el protocolo específico de limpieza seguido en la toma de muestra.

4.4.1. Procedimiento general de limpieza de material

Entre las condiciones de limpieza, hay que destacar el lavado al que fue sometido todo el material empleado en el laboratorio (matraces, pipetas, reactores de teflón, portafiltros, embudos, probetas, etc). El protocolo seguido para las muestras de agua fue el siguiente:

1. El material se lavó inicialmente con agua y jabón.
2. Tras enjuagarse el material con agua corriente, se volvió a enjuagar con agua Milli-RO. Posteriormente se lavó con HNO_3 (2 mol/L) tanto por fuera como por dentro; para ello se emplearon pequeñas porciones de ácido que se hicieron pasar por toda la superficie, repitiendo la operación al menos tres veces. El ácido empleado se descartó.

3. Se enjuagó tres veces con agua Milli-RO para retirar los restos de ácido.
4. Posteriormente se procedió a sumergir el material en baño cerrado de HNO_3 para análisis (2 mol/L) durante al menos una semana. Este ácido se preparó utilizando agua desionizada (Milli-Q) como disolvente y se renovó, al menos, una vez al mes en función de su uso.
5. Tras sacarse del baño de ácido, el material se enjuagó cuatro veces con agua desionizada (Milli-Q) y se secó en campana de flujo laminar.
6. Por último, se almacenó protegido dentro de bolsas de plástico transparente hasta su utilización.

En el caso del muestreo de sedimentos y tejidos de peces, la limpieza del material empleado no fue tan rigurosa. En este caso, el material fue limpiado 3 veces con agua Milli Q, tras lo cual se sumergió en un baño cerrado de HNO_3 para análisis (2 mol/L) durante un día. Posteriormente, se enjuagó con agua Milli Q 3 veces.

4.4.2. Procedimiento de limpieza en la toma de muestra de aguas

El material utilizado en la toma de muestra de aguas comprende los tubos de recogida de muestra, los cartuchos de filtración, los filtros de nylon y las botellas destinadas a recoger y almacenar las muestras.

Tubos de toma de muestra

En la toma de muestra se utilizaron dos tipos de tubos: uno de teflón rígido de FEP (6406-66 de Cole-Parmer Instrument Co. Illinois U.S.A) para la toma de muestras y varios tubos flexibles de Tygon (6424-71 de Cole-Pamer Instrument Co. Illinois U.S.A.) (tubo C-Flex) que se unen al de teflón rígido con el fin de ayudar en el avance del agua mediante el movimiento peristáltico de la bomba. Estos tubos fueron elegidos dada su baja capacidad de adsorción de metales y su alta resistencia al ataque ácido.

El tubo de teflón fue limpiado llenándolo con 3 mol/L de HCl para análisis mediante ayuda de la bomba peristáltica, y manteniéndolo así por un periodo no inferior a seis semanas hasta el momento de la toma de muestra. Para retener el ácido en el interior del tubo se unieron los dos extremos con un pequeño trozo de tubo C-Flex. El tubo lleno de ácido se guardó en una doble bolsa opaca, para preservarlo de posibles fuentes de contaminación, hasta el momento de la toma de muestra.

Para realizar la limpieza de los tubos C-Flex, éstos se dividieron en porciones de 30 cm de longitud que se mantuvieron dentro de un baño de 3 mol/L de HCl para análisis durante una semana. Después de este tiempo se enjuagaron con agua desionizada (Milli-Q) dentro

de una campana de flujo laminar. Una vez enjuagados se guardaron en bolsas con cierre hermético, que a su vez se almacenaron en una bolsa opaca. Estos tubos se conservaron de este modo hasta la realización de la toma de muestra.

Cartuchos de filtración

La limpieza de los cartuchos de filtración utilizados ((Whatman groundwater filter capsule, 0,45 μm 29705-92, Cole-Parmer Instrument Co. Illinois U.S.A.) se realizó en diversas etapas: en primer lugar, con ayuda de la bomba, se llenaron los cartuchos con metanol dejándose llenos durante 24 horas; para mantener los extremos unidos se empleó un pequeño trozo de tubo flexible de C-Flex. Pasado el tiempo requerido, se vació el metanol de los cartuchos y se lavaron con agua desionizada (Milli-Q) para retirar cualquier resto, dejándose llenos de agua durante 24 horas. Posteriormente, se les retiró el agua desionizada (Milli-Q) y se llenaron con HCl para análisis de concentración 0,5 mol/L, manteniéndose así durante una semana. Luego, se vaciaron de HCl y se lavaron con agua desionizada (Milli-Q) hasta retirar todo el resto de ácido. Es importante eliminar completamente el ácido clorhídrico del interior de los cartuchos, pues en el siguiente paso se utilizará ácido nítrico y la mezcla de ambos ácidos puede producir una degradación del filtro. Tras dejar los cartuchos llenos de agua desionizada (Milli-Q) durante 24 horas, se llenaron con disolución de ácido nítrico 0,5 mol/L, manteniéndose de esta manera dentro de bolsas con cierre hermético, que a su vez se guardaron en el interior de una doble bolsa opaca hasta su utilización. Los ácidos utilizados en esta limpieza pudieron ser reutilizados unas 5 veces sin que se perjudicara la calidad de limpieza del material.

Filtros de nylon

Los filtros de nylon de 0,45 μm fueron utilizados para obtener la materia suspendida de las muestras de agua. Los filtros se trataron en primer lugar con agua desionizada (Milli-Q) y luego se sumergieron en disolución de HNO_3 para análisis de concentración 2 mol/L durante una semana. Tras este periodo, se enjuagaron de nuevo con agua desionizada y se secaron en estufa, a 105°C hasta alcanzar un peso constante. Una vez secos, se guardaron en botes de poliestireno de 30 mL.

Botes de polietileno de baja densidad

Estos botes de polietileno de baja densidad (código 203010, Eurotubo, Deltalab, Barcelona) se utilizaron para recoger y almacenar las muestras de agua hasta su análisis. El proceso de limpieza requirió la presencia de dos personas que siguieron el protocolo *manos limpias-manos sucias*. En primer lugar, los botes se enjuagaron con agua desionizada (Milli-Q) 5 veces y se llenaron con disolución de HCl para análisis de concentración 3 mol/L, tapándose con su tapón y evitando que se creen burbujas en su interior. Así, se sumergieron en una disolución de HCl para análisis 0,1 mol/L en el interior de un bidón en el que se habían colocado previamente varias bolsas opacas que recubrían la pared del

recipiente para evitar la posible contaminación de los botes por contacto. Se cerraron las bolsas y se precintó el bidón para evitar la salida de vapores ácidos. Los botes deben permanecer en el interior del baño ácido al menos seis semanas. Pasado este tiempo, se enjuagaron 5 veces con agua desionizada (Milli-Q) en el interior de una campana de flujo laminar. Una vez enjuagados, se introdujeron en dobles bolsas de plástico con cierre hermético. Los ácidos utilizados durante este proceso pudieron ser reutilizados 5 veces sin que afectara a posteriores limpiezas.

4.5. Equipos y metodología

4.5.1. Equipos utilizados

Las medidas por Voltamperometría de Redisolución Catódica Adsorbtiva de Impulso Diferencial (DPAdCSV) fueron realizadas con el equipo 757 VA Computrace Stand (Metrohm, Suiza), controlado mediante el software VA Computrace 2.0 instalado en un ordenador personal, con la interfase 5326 VA Computrace Interfase (Metrohm, Suiza).

Las medidas por Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS) fueron llevadas a cabo utilizando el Espectrómetro de Masas X7 Series (ICP-MS) (Thermo Elemental, Reino Unido).

Las medidas de Absorción Atómica por Generación de Hidruros (HGAAS) se realizaron con el equipo de AAS Solaar M-Series Thermo Elemental acoplado al accesorio HG Unicam VP90 (Thermo Elemental, Reino Unido).

La materia orgánica de las muestras de agua fue digerida mediante radiación UV con el equipo de digestión 705 UV Digester (Metrohm, Suiza) de lámpara a alta presión de mercurio (220V, 50Hz), empleando para ello cubetas de cuarzo.

El carbono orgánico disuelto (COD) en las muestras de agua fue evaluado usando un equipo analizador de carbono, modelo 3100 (Analytik Jena, Alemania).

La digestión ácida de las muestras biológicas fue realizada mediante un microondas Ethos 1600 Microwave Heating (Milestone, Italia).

Para la evaluación del contenido de materia orgánica en la materia suspendida se empleó un horno mufla N 20/Hr (Nabertherm®, Alemania).

La agitación de las muestras durante el proceso de lixiviación se efectuó con un agitador Promax 2020 Shaker (reciprocal motion) (Heidolph, Alemania) y los extractantes fueron centrifugados en una centrifuga 4K10 Centrifuge (Sigma, Alemania).

Las muestras de tejidos de peces se liofilizaron mediante un equipo FreeZone® Triad 7400030 (Cole-Parmer, Illinois U.S.A).

Las medidas *in situ* de temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto del agua se realizaron con sonda multiparamétrica portátil Sension 156 (Hach Co., Estados Unidos).

Las medidas de pH realizadas en el laboratorio se realizaron en pH-metro MicroPH 2001 equipado con un electrodo combinado de vidrio Ag/AgCl modelo 52-02 y compensador de temperatura (Crison, España).

4.5.2. Metodología

El estudio de la contaminación metálica en la Bahía de Algeciras se realizó en dos etapas: en la primera de ellas (Abril de 2007) se tomaron sedimentos de 17 puntos a lo largo de toda la bahía y se analizó el contenido total metálico.

Una vez analizados esos 17 puntos, se identificaron aquéllos más representativos o contaminados de la bahía, y se eligieron 5 para el estudio del contenido total y la especiación en las aguas, peces y sedimentos a lo largo de 4 campañas de muestreo consecutivas, que se detallarán en la siguiente sección.

A continuación se detalla la metodología utilizada para el análisis de los parámetros generales, así como la concentración metálica y su especiación en las muestras de agua, sedimentos y peces.

4.5.2.1. Análisis de parámetros generales

Los parámetros físico-químicos tales como pH, temperatura, salinidad, conductividad, sólidos disueltos totales y oxígeno disuelto se midieron *in situ* mediante una sonda multiparamétrica portátil, calibrada previamente en el laboratorio.

Además se evaluaron los siguientes parámetros en el laboratorio:

- Materia suspendida en el agua

Para calcular la cantidad de materia suspendida que contenían las muestras de agua, se tomó un volumen conocido de agua y se filtró a vacío utilizando filtros de nylon de 0,45 μm de tamaño previamente tarados. Los filtros se secaron en estufa a 105°C hasta peso constante. El contenido de materia suspendida se obtuvo por diferencia de peso seco del filtro antes y después de filtrar el agua.

- **Materia orgánica en la materia suspendida**

El porcentaje de materia orgánica en la materia suspendida se calculó utilizando los mismos filtros que se habían utilizado previamente para hallar la cantidad de materia suspendida. De esta manera, una vez que la materia suspendida quedó retenida en los filtros y éstos se secaron en la estufa, fueron posteriormente calcinados en un horno de mufla Logotherm (Dinamarca) a 550°C durante 3 horas. A partir de la pérdida de peso por calcinación, se calculó la cantidad de materia orgánica contenida en la materia suspendida.

- **Carbono orgánico disuelto (COD)**

El carbono orgánico disuelto se midió sobre las muestras de agua filtradas y acidificadas con HCl (calidad Suprapur, Merck (Alemania)). Para ello se empleó el equipo analizador de carbono, modelo 3100 (Analytik Jena, Alemania) y se utilizó el procedimiento previamente detallado en el apartado 3.5.2.1 del capítulo 3 de esta tesis.

- **Materia orgánica en los sedimentos**

El análisis de la materia orgánica se realizó sobre la fracción inferior a 2 mm (eliminando los gruesos) como porcentaje de sólidos volátiles (SV) y fue determinada como pérdida de peso por combustión en horno mufla a 550 °C durante 30 min.

4.5.2.2. Especiación de As en aguas

La especiación de As en agua se realizó a partir del esquema que se presenta en la Figura 4.6, el cual distingue entre la fracción de As total, As inorgánico y As orgánico, tanto en la fase disuelta como en la particulada. La fracción de As orgánico es la que presenta una menor toxicidad.

Para realizar la especiación de As en las aguas, las muestras fueron tratadas con dos tipos de digestiones diferentes mediante microondas, una digestión con un ácido fuerte, en la que se obtienen las especies de arsénico inorgánico (digestión A), y una segunda digestión con una combinación de un ácido fuerte y un ácido oxidante, que provoca la digestión de la materia orgánica e inorgánica, obteniéndose todo el arsénico de la muestra (digestión B) [Niedzielski y col., 1999].

Digestión A: Arsénico Total Inorgánico

La noche anterior a ser medida, se sacó la muestra de agua acidificada con HCl Suprapur y se dejó descongelar en el frigorífico. Al día siguiente, se le añadió una cantidad suficiente de HCl para que la concentración final en la muestra de este ácido llegara a ser

1% en volumen. Así, las muestras se digirieron mediante microondas a 530 W durante 5 minutos, y fueron analizadas.

Digestión B: Arsénico Total

A las muestras de agua acidificadas con HCl, se les añadió HCl y HNO_3 de forma que la concentración final de ambos en las muestras fuera 1% v/v. Estas muestras se digirieron mediante microondas a 530 W durante 5 min y se analizaron obteniendo la concentración de As total.

Las digestiones A y B fueron aplicadas tanto a las muestras de agua filtrada como a las no filtradas, obteniéndose por diferencia el valor de As inorgánico y orgánico en la materia en suspensión. Las digestiones se realizaron tomando dos réplicas de 45 mL de agua acidificada, que fueron digeridas y enrasadas a 50 mL. Posteriormente, los análisis de estas muestras se realizaron empleando la técnica de análisis de espectroscopía de absorción atómica con generación de hidruros (HGAAS).

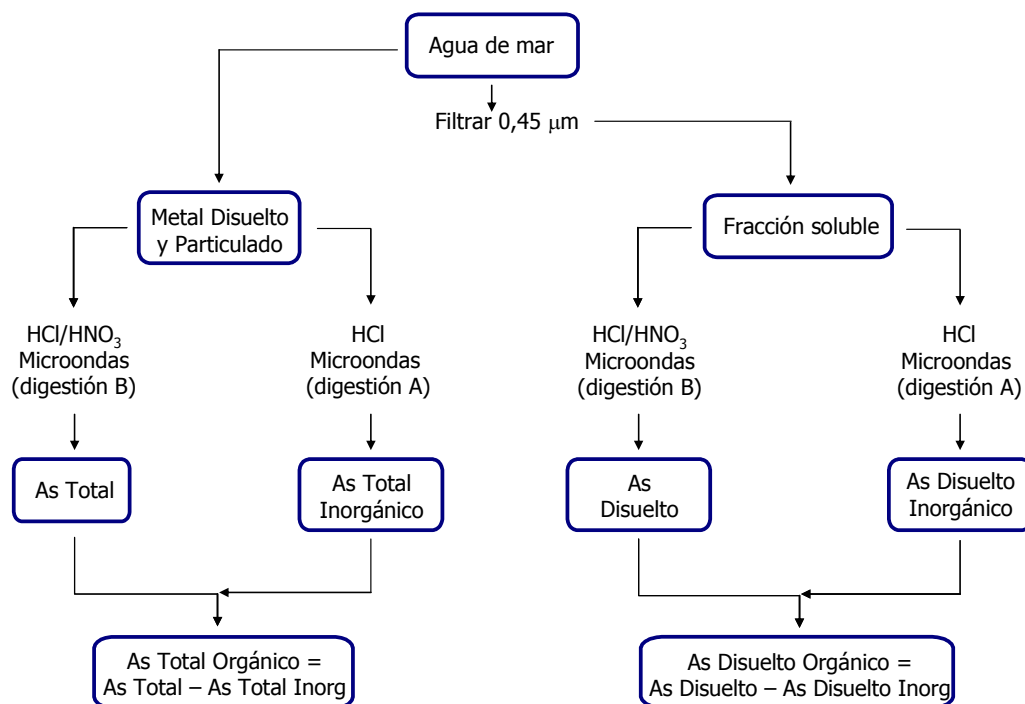


Figura 4.6. Esquema de fraccionamiento aplicado al análisis de As en las muestras de agua

4.5.2.3. Especiación de Ni y Co en aguas

El esquema de fraccionamiento en muestras acuosas basado en cambios de pH ha sido muy utilizado en las últimas décadas debido a su simplicidad y aplicabilidad [Duinker y Kramer, 1977; Hasle y Abdullah, 1981; Fischer y col. 1984; Batley, 1987; Vicente-Martorell y col., 2009].

El esquema de especiación (Figura 4.7) aplicado al análisis de Ni y Co en aguas separa las especies en distintas fracciones: el metal total se fracciona en metal disuelto y metal particulado, y a su vez el metal disuelto se separa en metal disuelto lábil y metal disuelto poco/no lábil. Siguiendo este diagrama de especiación, las muestras se sometieron a los siguientes pretratamientos y posteriores análisis.

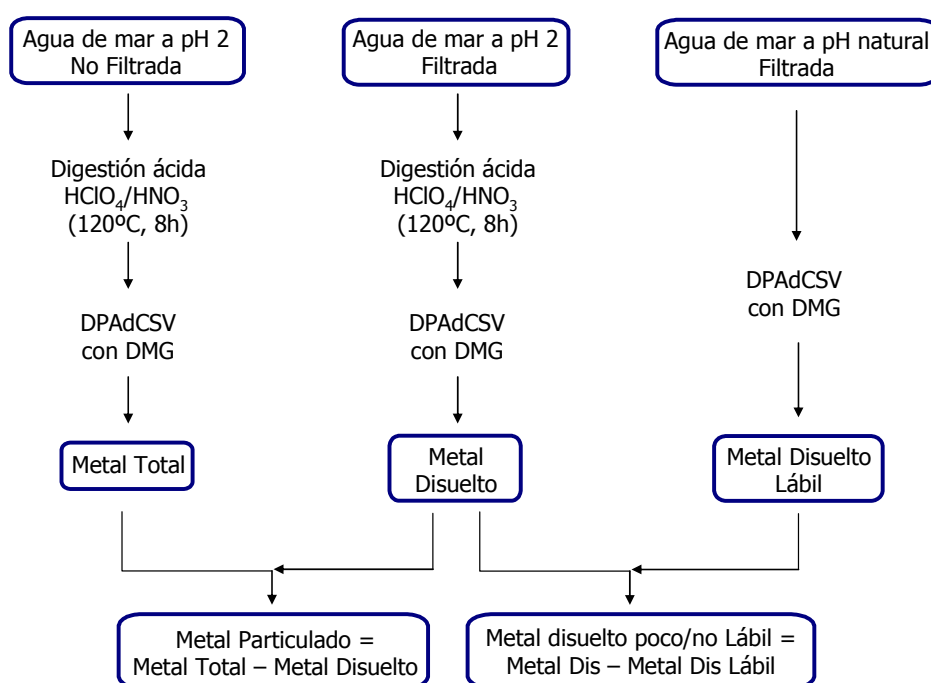


Figura 4.7. Esquema de fraccionamiento aplicado a Ni y Co en las muestras de agua

Metal Total

La noche anterior a ser medida, se sacó la muestra no filtrada y acidificada con HNO_3 del congelador y se descongeló en el interior del frigorífico. Posteriormente, se dejó

atemperar la muestra a la temperatura del laboratorio y se realizó un ataque ácido de 45 mL de muestra en reactores de teflón, empleando para ello el siguiente procedimiento:

- Se depositaron 45 mL de muestra en un reactor de teflón (PTFE) de 150 mL de capacidad (BRAND, 1305 38, Weirtheim, Germany).
- Se añadieron 0,2 mL de HNO_3 (Merck, calidad Suprapur) y 0,125 mL de HClO_4 (Merck, calidad Suprapur).
- Se calentó a 120°C en la estufa durante 8 horas.
- Se enfrió a temperatura ambiente.
- Se arrastró la muestra con Milli-Q y se enrasó a 50 mL.
- Las muestras se conservaron en recipientes de poliestireno a 4°C hasta su análisis.

La muestra se midió por voltamperometría de redisolución catódica adsorptiva de pulso diferencial (DPAdCSV) con electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE), a pH 9,5 y utilizando el método descrito por Metrohm [Application Bulletin, nº 231/2e]. Para ello se tomaron 5 mL de la muestra digerida, se enrasaron a 10 mL con agua Milli-Q, se añadieron 0,5 mL de tampón $\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$ ($[\text{NH}_4\text{Cl}] = 2 \text{ mol/L}$ y $[\text{NH}_3] = 6 \text{ mol/L}$) para ajustar el pH a 9,5 y se adicionaron 0,1 mL del reactivo dimetilglioxima (DMG) 0,05 mol/L disuelto en etanol.

Metal Disuelto

Se procedió igual que con la muestra anterior en el procedimiento de descongelación y de ataque ácido pero utilizando la muestra filtrada y acidificada con HNO_3 Suprapur. La muestra se midió por DPAdCSV, tal y como se ha descrito para la fracción de Metal Total.

Metal Particulado

Se obtuvo por diferencia entre la cantidad de Metal Total y Metal Disuelto.

Metal Disuelto Lábil

La noche anterior a ser medida, se sacó la muestra filtrada conservada a pH natural del congelador y se descongeló en el interior del frigorífico. La muestra se midió por DPAdCSV, al igual que la fracción de Metal Total, lo antes posible para evitar los equilibrios de adsorción-desorción y precipitación-disolución de los metales.

Metal Disuelto Poco o No Lábil

Se obtuvo por diferencia entre la cantidad de Metal Disuelto y Metal Disuelto Lábil.

Las condiciones electroquímicas de medida por DPAdCSV para Ni y Co se registran en la Tabla 4.1

Tabla 4.1. *Parámetros instrumentales característicos utilizados en la técnica DPAdCSV para el análisis de Ni y Co*

Parámetros electroquímicos	Ni y Co
Potencial de deposición: E_d	-700 mV
Tiempo de deposición: t_d	300 s
Amplitud de pulso: U_{ampl}	50 mV
Tiempo de pulso: t_{pulse}	0,04 s
Salto de potencial: U_{step}	4 mV
Intervalo de tiempo para el salto de potencial: t_{step}	0,30 s
Velocidad de barrido	13,3 mV/s
Potencial inicial de barrido	-800 mV
Potencial final de barrido	-1300 mV

4.5.2.4. Especiación de Cr en aguas

El esquema de especiación (Figura 4.8) aplicado al análisis de Cr en las aguas separa las especies en distintas fracciones: el cromo total se fracciona en cromo disuelto y cromo particulado; además se cuantifican el cromo disuelto activo (contribución de Cr(VI) disuelto y Cr(III) disuelto activo), Cr(VI) disuelto, Cr(III) disuelto activo y Cr(III) disuelto no activo. Este esquema de fraccionamiento ha sido ampliamente utilizado en la especiación de Cr en aguas naturales [Boussemart y col., 1992; Li y Xue, 2001; Bobrowski y col., 2004; Jorge y col., 2010]. Se basa en el análisis por voltamperometría de redisolución catódica adsorbtiva de un complejo formado entre el Cr(III) y el ácido dietilentriaminopentacético (DTPA), con la acción catalítica del nitrato.

En previos estudios se ha demostrado que la especie predominante de Cr(VI) en disolución acuosa para valores de pH mayor que 6 es CrO_4^{2-} , la cual es una especie totalmente electroactiva por lo que puede ser analizada por voltamperometría alcanzando porcentajes de recuperación de $100 \pm 3\%$ [Li y Xue, 2001]. Sin embargo, la recuperación de Cr(III) no siempre es cuantitativa, indicando que sólo un porcentaje de Cr(III) es electroactivo. Según Bobrowski y colaboradores, las especies de Cr(III) activas incluyen el

Cr(III) libre y los complejos inorgánicos, mientras que el Cr(III) no activo está formado por complejos orgánicos de cromo [Bobrowski y col., 2004]. Estas propiedades de cada una de las especies de cromo resultan muy útiles para el estudio de especiación de este metal.

Por otra parte, se ha demostrado que la señal analítica producida al aplicar la técnica voltamperométrica se debe a la reducción del complejo Cr(III)-DTPA adsorbido en el electrodo de trabajo a Cr(II)-DTPA. En el caso de Cr(VI), la formación, adsorción y reducción del complejo Cr(III)-DTPA requiere una etapa previa de reducción de Cr(VI) a Cr(III), que se obtiene aplicando potenciales más negativos que -0,05 V. Esta reducción de Cr(VI) a Cr(III) es irreversible, de forma que el Cr(VI) presente en la muestra, formará inmediatamente después de su reducción un complejo con DTPA [Sander y col., 2003]. Por tanto, la suma de las concentraciones de Cr(III) activo y Cr(VI) puede ser determinada por voltamperometría de redisolución catódica adsorptiva mediante la adición del ligando DTPA y aplicando un potencial previo más negativo que -0,05 V (usualmente se utiliza un potencial inicial de deposición de -1 V, garantizando así que todo el Cr(VI) se haya reducido a Cr(III) [Sander y col., 2002]). A esta suma de Cr(III) activo y Cr(VI) se conoce como Cromo Activo. Asimismo, todas las fracciones de cromo se analizaron utilizando un potencial de deposición de -1 V para que el Cr(VI) presente en las muestras diera una señal electroactiva en el equipo y pudiera ser determinado.

Además, en estos estudios se comprobó que la estequiometría del complejo de Cr(III) con DTPA en exceso utilizando el método espectrofotométrico de variaciones continuas, era 1:1 cuando la medida de absorbancia se realizaba inmediatamente después de la adición del ligando. Sin embargo, cuando se dejaba pasar cierto tiempo (entre 15 y 30 minutos), y en presencia de exceso de ligando, se formaba un segundo complejo con estequiometría 1:2 (metal:ligando). En este complejo el Cr(III) tiene sus 6 sitios de coordinación ocupados por las dos moléculas de DTPA. De esta manera, el ión Cr(III) se encuentra protegido estéricamente llegando a ser electroquímicamente inactivo [Sander, 2003]. Esta propiedad del complejo Cr(III)-DTPA se usa para analizar la concentración de Cr(VI) en la muestra.

Según lo mencionado anteriormente, se pueden diferenciar las especies de cromo que se detallan en la Figura 4.8.

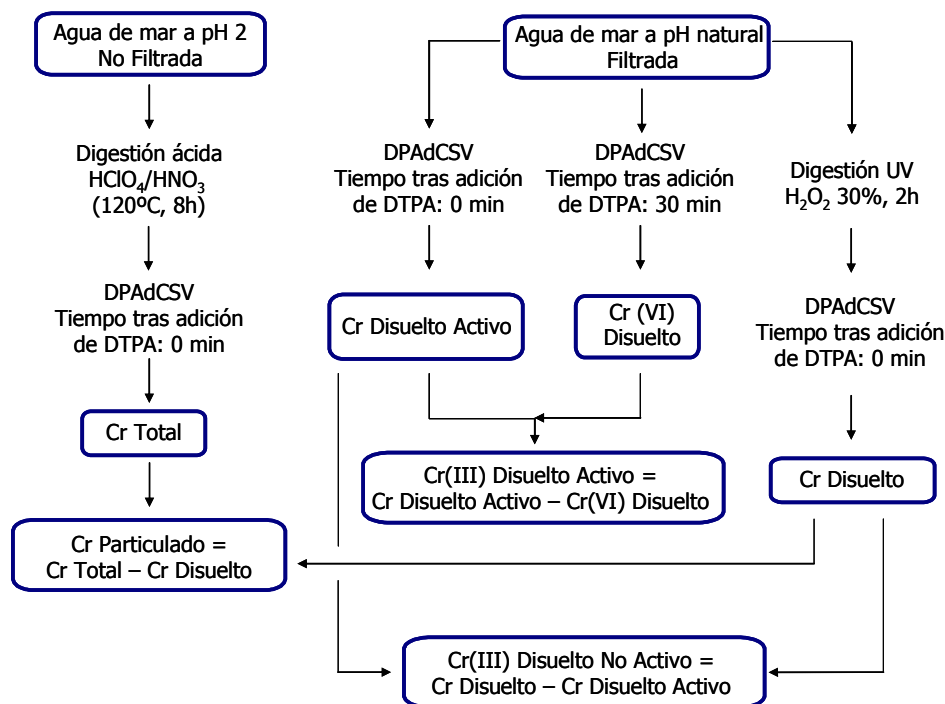


Figura 4.8. Esquema de fraccionamiento aplicado al Cr en las muestras de agua

Siguiendo este diagrama de especiación, las muestras se sometieron a los siguientes pretratamientos y posteriores análisis:

Cromo Total

La noche anterior a ser medida, se sacó del congelador la muestra no filtrada y acidificada con HNO₃ Suprapur y se descongeló en el interior del frigorífico. Posteriormente, se atemperó la muestra a la temperatura del laboratorio y se realizó un ataque ácido de 45 mL de muestra en reactores de teflón, empleando para ello el mismo procedimiento que se describió para el caso de Ni y Co.

La muestra se midió por DPAdCSV a pH 6,2 utilizando el método descrito por Metrohm [VA Application Note nº V-82; Application Bulletin, nº 116/3e]. Para ello se tomaron 5 mL de la muestra digerida, se enrasaron a 10 mL con agua Milli-Q y se añadieron 2,5 mL de electrolito soporte+reactivo (preparado en 100 mL utilizando acetato de sodio de concentración 0,2 mol/L, 0,05 mol/L de DTPA y 2,5 mol/L de nitrato de sodio), con un pH final de 6,2. El tiempo de espera entre la adición del electrolito y la medida debió ser

mínimo para que el complejo Cr(III)-DTPA no se inactivara. Cuando la muestra se colocó en el equipo, se aplicó un potencial de deposición de -1 V para que todo el Cr(VI) se redujera a Cr(III) y formara complejo con la DTPA. De esta manera, tanto el Cr(III) como el Cr(VI) fueron analizados, obteniéndose la fracción de cromo total.

Cromo Disuelto

La noche anterior a ser medida, se sacó la muestra filtrada conservada a pH natural del congelador y se descongeló en el interior del frigorífico. Posteriormente, se atemperó la muestra a la temperatura del laboratorio y se realizó una digestión oxidante con radiación UV y H₂O₂. Para ello se tomaron 10 mL de muestra en tubos de cuarzo, se añadieron 50 µL de H₂O₂ y se digirieron durante 2 horas, en un equipo 705 UV Digester. Posteriormente, la muestra se midió por DPAdCSV, tal y como se ha descrito para la determinación de Cromo Total. Con este procedimiento de radiación UV y H₂O₂ se descompone la materia orgánica, y procediendo de la misma manera que con la fracción de cromo total pero con la muestra filtrada, se obtuvo el cromo disuelto, que incluye las especies de Cr(VI), Cr(III) activo y Cr(III) no activo.

Cromo Disuelto Activo

La noche anterior a ser medida, se sacó la muestra filtrada conservada a pH natural del congelador y se descongeló en el interior del frigorífico. Tras ser atemperada, se midió por DPAdCSV, de la misma manera descrita para la determinación de Cromo Total, es decir con adición de electrolito soporte conteniendo DTPA y medida inmediata. En este caso, también se aplicó un potencial de deposición de -1 V para reducir todo el Cr(VI) a Cr(III) y obtener así la fracción de cromo disuelto activo, que se corresponde con la suma de Cr(VI) y Cr(III) activo.

Cromo(VI) Disuelto

La noche anterior a ser medida, se sacó la muestra filtrada conservada a pH natural del congelador y se descongeló en el interior del frigorífico. Tras ser atemperada, se midió por DPAdCSV, tal y como se ha descrito para la determinación de Cromo Total, pero en este caso se debió de esperar un mínimo de 30 minutos entre la adición del electrolito+reactivo y la medida, con el fin de que el complejo Cr(III)-DTPA quedara inactivo. De esta manera se consiguió enmascarar el Cr(III) en la muestra. Tras la espera de 30 minutos, se aplicó a la muestra un potencial de reducción de -1 V para que el Cr(VI) se redujera a Cr(III) y se complejara con la DTPA, produciéndose el complejo Cr(III)-DTPA activo que se midió en ese momento. De esta forma sólo se analizó la fracción de Cr(VI) disuelto.

Cromo Particulado

Se obtiene por diferencia entre la cantidad de Cromo Total y Cromo Disuelto.

Cromo(III) Disuelto Activo (Cr(III) libre y complejos inorgánicos)

Se obtuvo por diferencia entre la cantidad de Cromo Disuelto Activo y Cr(VI) Disuelto.

Cromo(III) Disuelto No Activo (complejos orgánicos de Cr(III))

Se obtuvo por diferencia entre la cantidad de Cromo Disuelto y Cromo Disuelto Activo.

Las condiciones electroquímicas de medida por DPAdCSV para Cr se registran en la Tabla 4.2

Tabla 4.2. *Parámetros instrumentales característicos utilizados en la técnica DPAdCSV para el análisis de Cr*

Parámetros electroquímicos	Cr
Potencial de reducción de Cr(VI) a Cr(III) y de deposición del complejo: E_d	-1000 mV
Tiempo de deposición: t_d	20 s
Amplitud de impulso: U_{ampl}	50 mV
Tiempo de impulso: t_{pulse}	0,04 s
Salto de potencial: U_{step}	6 mV
Intervalo de tiempo para el salto de potencial: t_{step}	0,10 s
Velocidad de barrido	59,5 mV/s
Potencial inicial de barrido	-1000 mV
Potencial final de barrido	-1400 mV

4.5.2.5. Análisis del contenido total de metales en sedimentos

Los análisis de metales totales y su especiación en los sedimentos se realizaron sobre la fracción fina de éstos. Para ello se realizó el pretratamiento de las muestras que se detalla a continuación:

- La muestra se sacó del congelador, se disgregó y se dejó en el frigorífico hasta su descongelación.
- El sedimento se colocó en vidrios de reloj y se secó en estufa a 40°C hasta llegar a sequedad total.

- Una vez seco, se hizo un tamizado previo del sedimento a través de un tamiz de acero inoxidable de 2 mm de paso de luz de malla para eliminar los gruesos.
- Se tomaron pequeñas fracciones de la fracción obtenida y se molturaron en un mortero de ágata hasta conseguir un polvo muy fino.
- Se tamizó el sedimento molturado a través de un tamiz de nylon de 63 μm de paso de luz de malla para separar la fracción más fina, la cual se almacenó en botes de polietileno de 50 mL de capacidad hasta su tratamiento y análisis.

Para evaluar el contenido metálico total de los sedimentos se aplicó un procedimiento de digestión ácida mediante uso de radiación infrarroja. Las etapas a seguir fueron las siguientes:

- Se pesaron con exactitud alrededor de 0,200 g de sedimento (fracción fina) en una placa de teflón.
- Se añadieron 5 mL de HF al 48 % para digerir el sedimento y se dejó evaporar hasta sequedad con radiación infrarroja. Este proceso se repitió una vez más.
- Después, se añadieron 5 mL de ácido nítrico al 65 % y se dejó que se evaporara hasta sequedad (2 veces).
- El residuo seco digerido se extrajo con 20 mL de ácido clorhídrico 3,86 mol/L mediante agitación magnética y calefacción a 85 ± 5 °C durante 1 hora.
- Se dejó enfriar la disolución obtenida hasta temperatura ambiente y se filtró con papel de filtro Albet 1238.
- Se enrasó la disolución filtrada y las aguas de lavado hasta 50 mL.
- Se almacenó en recipientes de polietileno a 4 °C hasta su análisis.

El análisis de metales en las muestras de sedimento se llevó a cabo por Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS).

4.5.2.6. Especiación de metales en sedimentos

Los metales en el suelo pueden encontrarse bajo distintas formas: como ión libre, en forma complejada en la disolución del suelo, adsorbidos o en forma intercambiable en la fracción coloidal del suelo (arcilla, compuestos húmicos, hidróxidos de hierro, manganeso y aluminio), o formando parte de minerales secundarios, primarios y complejos insolubles en la fase sólida del suelo.

Inicialmente, se hizo un estudio de 17 puntos de muestreo en la Bahía de Algeciras, en donde se evaluó el contenido de metal más fácilmente disponible del sedimento mediante

una extracción simple. Esta extracción se realizó por duplicado haciendo uso de dos extractantes diferentes. Así, uno de ellos fue el ácido acético 0,11 mol/L, comúnmente utilizado en el primer paso de la extracción secuencial BCR, que se explicará a continuación, y el otro fue el agente complejante DTPA (ácido dietilentriaminopentacético) 0,005 mol/L junto con CaCl_2 0,01 mol/L y el buffer TEA (trietanolamina) 0,1 mol/L a pH 7,3 [Lindsay and Norvel, 1978]. El DTPA se utilizó para lixiviar las formas móviles (complejas, adsorbidas y carbonatadas) de los metales.

El procedimiento de extracción con DTPA fue el siguiente:

- Se pesaron 3 g de fracción fina del sedimento seco en un tubo de centrífuga.
- Se añadieron 15 mL del extractante (DTPA 0,005 mol/L, CaCl_2 0,01 mol/L y TEA 0,1 mol/L a pH 7,3) y se agitó mecánicamente durante 2 horas a 120 traslaciones por minuto.
- El sobrenadante se filtró por gravedad a través de papel de filtro de tamaño de poro 20-25 μm (Filter-Lab 1238, Filtros Anioia, Barcelona) y se acidificó con HNO_3 suprapur para preservar los metales en disolución.
- La fase líquida se conservó a 4 °C hasta su análisis por ICP-MS.

Para el análisis de especiación de los sedimentos de los 5 puntos elegidos, se aplicó el procedimiento de extracción secuencial para metales traza propuesto por el BCR (Programa de Medición y Ensayo de la Comisión Europea) [Davidson y col., 1999]. Está basado en la extracción con ácido acético (paso 1), cloruro de hidroxilamonio (paso 2) y ataque con peróxido de hidrógeno y extracción con acetato amónico (paso 3). Por último, el residuo obtenido fue tratado mediante digestión ácida.

El ácido acético libera los metales asociados con carbonato cálcico, caolinita, feldespato potásico y ferrihidrita. El cloruro de hidroxilamonio libera los metales procedentes de montmorillonita y dióxido de manganeso, así como el níquel del ácido húmico. Los óxidos de hierro deben esperar a ser atacados por este agente reductor, pero la mayoría de los metales ya han sido lixiviados por el primer extractante (ácido acético). Esto puede reflejar la elevada capacidad de adsorción de la ferrihidrita. La tercera extracción con peróxido de hidrógeno/acetato amónico posee la fuerza necesaria para digerir la materia orgánica y el material sulfhídrico.

Con la aplicación del método del BCR se obtienen tres fases líquidas, que se corresponden con la *Fase 1 o intercambiable*, la *Fase 2 o reducible* y la *Fase 3 u oxidable*.

La *Fase 1* incluye los metales solubles en aguas y en ácidos débiles, intercambiables o enlazados a carbonatos, que pueden pasar fácilmente a la columna de agua en determinadas condiciones, por ejemplo cuando el pH disminuye. Es la fracción que

contiene los enlaces metal-sedimento más lábiles y, por tanto, la más fácilmente disponible desde el punto de vista medioambiental.

La *Fase 2* contiene los metales que son fácilmente reducibles, normalmente asociados a los óxidos de hierro y manganeso. Estos metales pueden ser liberados a la columna de agua si el sedimento cambia de un estado oxigenado a uno anóxico, hecho que podría ser causado por la actividad de microorganismos presentes en el sedimento.

La *Fase 3* incluye aquellos metales asociados a la materia orgánica y sulfhídrica que son fácilmente oxidables. Estos metales pueden pasar al agua bajo condiciones oxidantes. Dichas condiciones pueden ocurrir cuando el sedimento es resuspendido (bien mediante dragados, corrientes, inundaciones o mareas) y las partículas entran en contacto con el agua bien oxigenada.

La cantidad o concentración de los metales en estas asociaciones o fracciones se encuentra influida por distintos factores, entre los que destacan la cantidad de iones en el suelo/sedimento, el tipo y número de lugares de adsorción en la fase sólida, el tipo y la concentración de los ligandos capaces de formar complejos con los metales presentes en el suelo/sedimento, el pH, el potencial redox, la temperatura y el régimen de humedad. El cambio en uno o varios de estos factores producirá una modificación en el equilibrio entre las distintas fases y, por tanto, una transferencia de metal de unas a otras [González y col., 2009].

A continuación se describe la metodología empleada en cada una de las fases.

Fase 1: fase intercambiable (metales solubles en agua y ácidos débiles, y enlazados a carbonatos)

- Se pesó 1 g de fracción fina del sedimento seco en un tubo de centrifuga.
- Se añadieron 40 mL de ácido acético 0,11 mol/L, se tapó y se agitó mecánicamente durante 16 horas a 150 traslaciones por minuto; no se debía demorar la agitación después de añadir el ácido.
- Se centrifugó la suspensión durante 30 minutos (a 4000 rpm y 4 °C de temperatura) y se separó el extractante del residuo mediante una pipeta.
- La fase líquida se conservó a 4 °C hasta su análisis.
- El residuo se lavó con 20 mL de agua Milli-Q agitando mecánicamente durante 15 minutos y centrifugando durante 30 minutos (a 4000 rpm y 4 °C de temperatura).
- Finalmente, se rechazó el sobrenadante y se conservó el residuo.

Fase 2: fase reducible (metales fácilmente reducibles, asociados a óxidos de Fe y Mn)

- Se añadieron 40 mL de un agente reductor, el cloruro de hidroxilamonio 0,5 mol/L (estabilizado a pH 1,5 con ácido nítrico y preparado en los días en los que se realiza la extracción) al residuo de la Fase 1.
- Se tapó el tubo de centrifuga, se rompió el residuo por vibración y se realizó la lixiviación agitando mecánicamente durante 16 horas a 150 traslaciones por minuto, sin demorar la agitación tras la adición del cloruro.
- Se centrifugó la suspensión durante 30 minutos (a 4000 rpm y 4 °C de temperatura) y se separó el extractante del residuo mediante una pipeta.
- La fase líquida se conservó a 4 °C hasta su análisis.
- El residuo se lavó con 20 mL de agua Milli-Q agitando mecánicamente durante 15 minutos y centrifugando durante 30 minutos (a 4000 rpm y 4 °C de temperatura).
- Finalmente, se rechazó el sobrenadante y se conservó el residuo.

Fase 3: fase oxidable (metales fácilmente oxidables asociados a la materia orgánica y sulfhídrica)

- Se añadió con cuidado y en pequeñas cantidades 10 mL de peróxido de hidrógeno 8,8 mol/L al residuo de la Fase 2.
- Se rompió el residuo por vibración y se cubrió el tarro, dejándolo a temperatura ambiente durante 1 hora, con agitación manual ocasional.
- La digestión continuó durante 1 hora más, a 85 ± 2 °C, con agitación manual ocasional la primera media hora, usando un baño de agua (Precistern de 20 L 6000141/6000388). La siguiente media hora se destapó el bote, y se dejó que el volumen se redujera a menos de 3 mL.
- Se añadieron otros 10 mL de peróxido de hidrógeno 8,8 mol/L, se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación ocasional, y se evaporó 1 hora a 85 °C hasta dejar 1 mL. No se llevó a sequedad.
- Posteriormente, se adicionaron 50 mL de acetato amónico 1 mol/L (acidificado a pH 2 con ácido nítrico) al residuo frío, se tapó y se dejó en agitación durante 16 horas a 150 traslaciones por minuto.
- Se centrifugó la suspensión durante 30 minutos (a 4000 rpm y 4 °C de temperatura) y se separó el extractante del residuo mediante una pipeta.
- La fase líquida se conservó a 4 °C hasta su análisis.

- El residuo se lavó con 20 mL de agua Milli-Q agitando mecánicamente durante 15 minutos y centrifugando durante 30 minutos (a 4000 rpm y una temperatura de 4 °C).
- Se rechazó el sobrenadante y se conservó el residuo.
- El residuo obtenido se secó en una estufa a 40 °C hasta sequedad total.

Digestión ácida del residuo de la fase III

Para la digestión ácida del residuo, se pesaron con exactitud unos 0,200 g del mismo procedente de la Fase 3 en una placa de teflón, y se aplicó el mismo procedimiento que se utilizó en el análisis del contenido metálico total. La única diferencia es que una vez finalizada la digestión, la disolución se enrasó en un matraz de 25 mL.

Es decir, siguiendo los pasos descritos se obtienen tres fases líquidas y una fase residual que se corresponden con:

- Fase I: fase intercambiable, metales solubles en agua y en ácidos débiles, y asociados a carbonatos.
- Fase II: fase reducible (óxidos de hierro y manganeso).
- Fase III: fase oxidable (materia orgánica y sulfhídrica).
- Fase IV o residual: Digestión ácida del residuo III.

Las fases obtenidas siguiendo este esquema de especiación fueron analizadas por Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS).

4.5.2.7. Análisis del contenido total de metales en muestras biológicas

Las muestras biológicas fueron analizadas después de realizar un pretratamiento de los tejidos mediante liofilización, para lo que se empleó el equipo "FreeZone® Triad 7400030". La liofilización es un proceso importante en la preparación, preservación y almacenamiento de productos biológicos, farmacéuticos y alimentos. Es un proceso por el cual se elimina el agua u otro disolvente del material congelado mediante la conversión directa del agua congelada en vapor sin la formación intermedia de agua líquida (sublimación). Este proceso se realiza mediante la absorción de calor por la muestra congelada con el fin de vaporizar el hielo, el uso de una bomba de vacío para mejorar la eliminación del vapor de agua de la superficie de la muestra, la transferencia del vapor de agua a un colector y la eliminación de calor por el receptor, a fin de condensar el vapor de agua.

En la Figura 4.9 se detalla el ciclo de liofilización que se empleó con los tejidos de peces. El proceso de liofilización constó de tres etapas, una primera etapa de precongelación (que duró 3 horas hasta alcanzar una temperatura de $-55\text{ }^{\circ}\text{C}$), una etapa de desecación primaria (en la cual se eliminó la mayor parte del agua de los tejidos, y que duró 18 horas hasta alcanzar $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$), y por último la etapa de desecación secundaria en la que se eliminó el agua intersticial de los tejidos (que duró 22 horas y acabó cuando se alcanzó la temperatura de $14\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Además de la liofilización, la metodología de análisis de las muestras biológicas incluyó posteriormente una etapa de digestión ácida de la muestra para su disolución. Las digestiones ácidas de las muestras descritas en la bibliografía científica se pueden clasificar en tres tipos, digestión ácida y calentamiento a presión ambiental [Zhou y col., 1998; Gladyshev y col., 2001; Mzimela y col. 2003], digestión ácida a alta presión mediante el empleo de reactores de teflón [Rashed, 2001; Soltan y col. 2005] y digestión ácida asistida por microondas [Aucoin y col., 1999; Karadede y Ünlü, 2000; Pyle y col., 2005]. Para realizar estas digestiones se suele emplear HNO_3 o una mezcla de HNO_3 y HClO_4 en distintas relaciones de volumen. En la digestión asistida por microondas se suele emplear HNO_3 y en ocasiones se combina con el efecto oxidante del H_2O_2 .

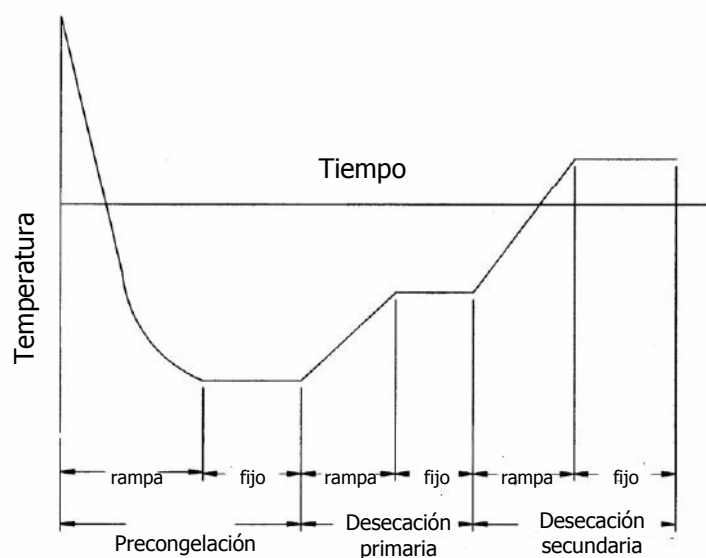


Figura 4.9. Representación esquemática del proceso de liofilización

En este estudio, para el pretratamiento de las muestras biológicas se optimizaron dos métodos de digestión ácida específicos para los distintos tipos de tejidos biológicos basados en el uso de microondas, un método para los tejidos de hígado y otro distinto para los tejidos de branquias y músculo. Así, se emplearon 4 mL de ácido nítrico y 2 mL de agua oxigenada para las muestras de hígado, con un mayor contenido en grasas, mientras que las muestras de músculo y branquia solo precisaron el empleo de 7 mL de ácido nítrico. Para ello se pesaron porciones comprendidas entre 0,1 y 0,3 g de peso de cada tejido. Para la digestión ácida asistida por microondas se empleó un programa de tres etapas, una primera etapa de 4 minutos a 200 vatios de potencia, una segunda etapa de 5 minutos a 400 vatios de potencia y una tercera etapa de 10 minutos a 600 vatios de potencia, tomándose la temperatura de 200 °C como temperatura de control durante todo el proceso. Después de la digestión con microondas las muestras se dejaron enfriar y se enrasaron hasta 25 mL con agua desionizada (Milli-Q), conservándose en botes de poliestireno hasta su análisis.

El análisis de las muestras digeridas se realizó mediante la técnica de Espectrometría de Masas con fuente de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS).

4.5.2.8. Tratamiento estadístico de los datos

Con el objetivo de estudiar las diferencias espaciales y temporales en el contenido metálico en agua, sedimentos y peces, así como estudiar las diferencias en el contenido metálico entre las especies estudiadas y tejidos seleccionados se aplicó el análisis de la varianza a los resultados obtenidos. Así mismo, para estudiar la relación existente entre las variables estudiadas se aplicaron análisis de correlación. Para el tratamiento estadístico de los datos este trabajo se ha utilizado el programa Statistica 7.0 (stat Soft. Inc., 2004).

Para la realización de estos análisis estadísticos se verificó la hipótesis de normalidad de varianzas mediante el test de Shapiro-Wilk o bien el test de Kolmogorov-Smirnov. El primer estadístico se emplea para distribuciones de datos pequeñas ($n < 30$) mientras que el segundo se utiliza en aquellas distribuciones con un gran número de datos ($n > 30$). Para verificar el supuesto de homogeneidad de las varianzas se utilizaron el test de Levene y el test de Brown & Forsythe. En los casos en los que no se obtuvo normalidad se procedió a realizar una transformación matemática de los datos, con el fin de conseguir datos normales cuando fuera posible.

En función del tipo de distribución de los datos, paramétrica o no paramétrica, se han empleado los estadísticos paramétricos del análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y el análisis de correlación de Pearson o los estadísticos no paramétricos de Kruskal-Wallis (ANOVA), análisis de comparación múltiple y análisis de correlación de Spearman. El grado de significación adoptado para evaluar estos análisis fue de $p < 0,05$.

4.6. Análisis de blancos, límite de detección y validación de las técnicas empleadas

Antes de iniciar el estudio de la concentración metálica en aguas, sedimentos y peces, se llevó a cabo la validación de las técnicas empleadas en cada una de las metodologías, así como el estudio de los blancos y el cálculo del límite de detección para cada uno de los metales.

4.6.1. Ni, Co y Cr en aguas por DPAdCSV

Con el fin de evaluar la posible contaminación producida durante el pretratamiento y el análisis de las muestras, se procedió al estudio de los blancos correspondientes a cada uno de los protocolos realizados en el análisis de muestras de aguas. Para evaluar los blancos correspondientes a cada fase del esquema de especiación se aplicó el mismo tratamiento pero la muestra fue agua desionizada (Milli-Q). Las condiciones electroquímicas de medida se registran en las Tablas 4.1 y 4.2. Los resultados para Ni y Co se detallan en la Tabla 4.3, y en la Tabla 4.4, para Cr.

Además, se evaluó el límite de detección y cuantificación de la técnica de análisis de estos metales por DPAdCSV, mediante la siguiente expresión:

$$\text{Límite de detección} = \frac{3 \cdot s_b}{m}$$

$$\text{Límite de cuantificación} = \frac{10 \cdot s_b}{m}$$

donde m es la pendiente de la recta de calibración y s_b es la desviación estándar de la señal analítica del blanco. Los límites de detección y cuantificación para el Ni, Co y Cr se muestran en la Tabla 4.5.

Tabla 4.3. Blancos de Ni y Co para cada fase de la especiación en agua ($\mu\text{g/L}$) ($t_d=300$ s; $n=3$)

Fase de la especiación	Ni	Co
Total	0,25 \pm 0,01	0,008 \pm 0,001
Disuelto	0,35 \pm 0,01	0,02 \pm 0,01
Disuelto Lábil	0,014 \pm 0,001	n.d.

Tabla 4.4. Blancos de Cr para cada fase de la especiación en agua ($\mu\text{g/L}$) ($t_d=20$ s; $n=3$)

Fase de la especiación	Cr
Total	$1,13 \pm 0,01$
Disuelto	$0,53 \pm 0,02$
Disuelto Activo	$0,55 \pm 0,01$
Cr(VI) Disuelto	$0,50 \pm 0,02$

Tabla 4.5. Límites de detección de Ni, Co y Cr para las medidas de DPAdCSV ($\mu\text{g/L}$) (t_d para Ni y Co=300 s; t_d para Cr=20 s; $n=10$)

	Ni	Co	Cr
Límite de detección ($\mu\text{g/L}$)	0,007	0,004	0,007
Límite de cuantificación ($\mu\text{g/L}$)	0,024	0,012	0,022

La validación del método se llevó a cabo mediante la medida de los niveles de Ni, Co y Cr en la muestra de referencia SLEW-3 (agua de estuario, filtrada y acidificada hasta pH 1,6) entre cuyos metales certificados se encuentra el Ni ($1,23 \pm 0,07 \mu\text{g/L}$), el Co ($0,042 \pm 0,010 \mu\text{g/L}$) y el Cr ($0,183 \pm 0,019 \mu\text{g/L}$).

El análisis de la muestra se realizó por triplicado siguiendo el siguiente protocolo:

- Se pusieron unos 10 mL de muestra de referencia en tubos de cuarzo.
- Se añadieron a cada tubo 50 μL de H_2O_2 (Merck, calidad suprapur).
- Las muestras se digirieron mediante irradiación con lámpara de mercurio de 550 W durante 2 horas, evitando que la muestra superase la temperatura de 78 °C para que no hirviera y se produjeran pérdidas de muestra. Luego se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se conservaron en recipientes de poliestireno.
- Mediante pesada se adicionaron en la celda de medida 10 mL de muestra utilizando el valor de densidad de la muestra para la transformación del peso en volumen.
- Se adicionó la disolución reguladora y la DMG en caso de Ni y Co, y en el caso del Cr se adicionó el electrolito soporte, midiendo las muestras por DPAdCSV.

Los resultados del análisis de la muestra de referencia se encuentran en la Tabla 4.6. Puede observarse que se obtuvieron porcentajes de recuperación muy próximos al 100%.

Tabla 4.6. Validación del método de análisis del contenido de Ni, Co y Cr en aguas mediante el empleo de la muestra de referencia de estuario SLEW-3 ($n=3$)

Metal	Valor observado ($\mu\text{g/L}$)	Valor certificado ($\mu\text{g/L}$)	Recuperación
Ni	$1,19 \pm 0,02$	$1,23 \pm 0,07$	96,9%
Co	$0,04 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$	101,5%
Cr	$0,17 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,02$	94,5%

4.6.2. As en aguas por HGAAS

En el caso de As, también se evaluaron los blancos correspondientes a cada uno de los protocolos realizados en cada fase de la especiación de las muestras de aguas. En todos los casos los blancos se realizaron por sextuplicado. Para ello se aplicó el siguiente protocolo:

- 500 mL de agua MQ sin filtrar que se acidificaron con 1 mL de HCl (calidad Suprapur, Merck) antes de proceder a su congelación.
- 500 mL de agua MQ filtrada a la que se le añadieron 1 mL de HCl (calidad Suprapur, Merck) antes de proceder a su congelación.

Estas muestras fueron digeridas y analizadas tal como se ha descrito anteriormente en la sección 4.5.2.2. En todos los casos los resultados obtenidos estuvieron por debajo del límite de detección de la técnica empleada (HGAAS), que fue calculado para 10 muestras de blanco, obteniéndose un valor de $0,098 \mu\text{g/L}$. Asimismo, también se calculó el límite de cuantificación, que resultó ser de $0,327 \mu\text{g/L}$ de As.

Para la validación del análisis de As en aguas por HGAAS, se procedió a realizar ensayos de recuperación. Las pruebas de recuperación consisten en un diseño experimental destinado a determinar la relación entre la cantidad de un analito hallada experimentalmente, mediante un cierto método, y la cantidad real puesta o agregada en ese experimento, empleando para ello muestras previamente analizadas. Constituye una aplicación del conocido método de las adiciones estándar o de las adiciones de analito. En este caso se ha optado por emplear solo dos puntos, correspondientes a la muestra antes y después de agregado el analito. La interpretación que se hace en este caso es que la diferencia entre ambas cantidades de analito determinadas debería corresponder exactamente a la cantidad agregada si el método es exacto.

El As se añadió antes de proceder a la digestión de las muestras. Para ello, se tomaron porciones de 500 mL de agua de mar filtrada y acidificada con HCl y se adicionaron en todos los casos $2,5 \mu\text{g/L}$ de metal. En la Tabla 4.7 se han recogido los valores obtenidos

para cada una de las muestras utilizadas en la validación. Los resultados dieron errores inferiores al 2 %.

Tabla 4.7. Resultados de los ensayos de recuperación de As en aguas con adiciones de 2,5 µg/L de As

Muestra	Valor medido sin adición (µg/L)	Valor medido con adición (µg/L)	Recuperación (%)
1	2,36 ± 0,12	4,90 ± 0,38	100,7
2	3,60 ± 0,23	6,01 ± 0,19	98,5
3	5,17 ± 0,46	7,65 ± 0,25	99,7

4.6.3. As, Ni, Co y Cr en sedimentos

Para analizar los blancos, calcular el límite de detección y validar las técnicas en el caso de los sedimentos, se ha distinguido entre el procedimiento para determinar las cantidades totales metálicas y el procedimiento para estudiar la especiación.

4.6.3.1. Contenido total de metales en sedimentos

Al igual que en el caso de las muestras de aguas, previa a la validación de la técnica se estudiaron los blancos y los límites de detección. Se analizó el contenido total de As, Ni, Co y Cr en 4 blancos utilizando el método de digestión total. La técnica de análisis empleada fue el ICP-MS. Los contenidos metálicos de los blancos para los 4 metales fueron menores que los límites de detección, que se detallan en la Tabla 4.8.

Tabla 4.8. Límites de detección (L.D.) de As, Ni, Co y Cr en el análisis de contenido metálico total en sedimentos y concentración de los blancos ($n_{L.D.}=10$, $n_{blancos}=4$)

Metal	L.D. (µg/L)	Concentración media del blanco ± S.D. (µg/L)
As	0,444	<L.D.
Ni	0,379	<L.D.
Co	0,101	<L.D.
Cr	0,712	<L.D.

La validación del método de digestión total se llevó a cabo mediante la medida de las concentraciones de As, Ni, Co y Cr en una muestra de referencia certificada de sedimento de estuario, denominada SRM 1646a. Para ello, se realizó la digestión total de una muestra de este sedimento por duplicado siguiendo el método descrito en el apartado 4.5.2.5. Los valores obtenidos se detallan en la Tabla 4.9. Se puede comprobar que se obtuvieron porcentajes de recuperación muy adecuados que validan los análisis realizados durante este estudio.

Tabla 4.9. Validación del método de análisis del contenido metálico total en la muestra de referencia SRM 1646a ($n=5$)

Metal	Valor observado (mg/kg)	Valor certificado (mg/kg)	Recuperación
As	5,20±0,50	6,23±0,21	83,5%
Ni	22,71±0,43	23 ^a	98,8%
Co	4,83±0,10	5 ^a	96,6%
Cr	37,05±1,12	40,9±1,9	90,6%

^a Valores informados en la descripción del material de referencia

4.6.3.2. Especiación de metales en sedimentos

Se analizaron los contenidos de As, Ni, Co y Cr en 4 blancos de preparación utilizando el método de extracción secuencial BCR. La técnica de análisis empleada fue el ICP-MS. Los contenidos metálicos de los blancos para los 4 metales en cada fase de la especiación, así como los límites de detección se recogen en la Tabla 4.10. Los valores de blancos y límites de detección para la fase 1 también fueron de aplicación en la extracción con ácido acético en los 17 sedimentos iniciales.

Tabla 4.10. Límites de detección (L.D.) y concentración media y desviación estándar de los blancos de As, Ni, Co y Cr en el análisis de especiación metálica en sedimentos ($n_{L.D.}=10$, $n_{blancos}=4$)

Metal	L.D. (µg/L)			
	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4
As	0,269	0,002	0,618	2,284
Ni	0,454	1,281	1,242	0,286
Co	0,068	0,001	0,118	0,105
Cr	0,727	1,345	0,297	0,829

Tabla 4.10 (cont.). Límites de detección (L.D.) y concentración media y desviación estándar de los blancos de As, Ni, Co y Cr en el análisis de especiación metálica en sedimentos ($n_{L.D.}=10$, $n_{blancos}=4$)

Metal	Concentración media del blanco \pm S.D. ($\mu\text{g/L}$)			
	Fase 1	Fase 2	Fase 3	Fase 4
As	<L.D.	<L.D.	<L.D.	11,206 \pm 4,678
Ni	<L.D.	13,608 \pm 2,313	9,223 \pm 0,780	2,016 \pm 0,032
Co	0,069 \pm 0,039	0,205 \pm 0,188	0,190 \pm 0,167	<L.D.
Cr	<L.D.	21,845 \pm 2,816	7,454 \pm 0,550	73,155 \pm 11,838

El método de análisis para determinar el contenido metálico de cada fase fue validado utilizando la muestra de referencia certificada BCR-701, que es una muestra de sedimento de lago que certifica cada una de las etapas del método de extracción secuencial para la especiación metálica del BCR, así como las extracciones con ácido acético de los 17 sedimentos iniciales (dado que el procedimiento coincidía con la primera fase del BCR). Los metales analizados fueron Ni y Cr, que son los que están certificados en la muestra de referencia, realizando los análisis por duplicado. Los valores obtenidos se detallan en la Tabla 4.11. De los datos obtenidos puede concluirse que se ha validado el método de extracción secuencial BCR de manera satisfactoria para ambos metales en las tres fases. La validación de la fase residual es equiparable a la realizada para el contenido total del sedimento, puesto que el método empleado es el mismo.

Tablas 4.11. Validación del análisis del contenido metálico de las Fases 1, 2 y 3 del esquema de extracción BCR de los sedimentos mediante el empleo de la muestra de referencia certificada BCR-701 ($n=4$)

Fase	Metal	Valor observado (mg/kg)	Valor certificado (mg/kg)	Recuperación
Fase 1	Ni	16,13 \pm 0,14	15,4 \pm 0,9	104,8%
	Cr	2,72 \pm 0,17	2,26 \pm 0,16	120,3%
Fase 2	Ni	24,73 \pm 2,44	26,6 \pm 1,3	93,0%
	Cr	43,72 \pm 4,00	45,7 \pm 2,0	95,7%
Fase 3	Ni	15,30 \pm 2,16	15,3 \pm 0,9	99,9%
	Cr	131,04 \pm 7,82	143 \pm 7	91,6%

Respecto a las extracciones realizadas con DTPA, se estudiaron también los blancos y los límites de detección para cada uno de los metales. Los resultados se encuentran en la Tabla 4.12.

Tabla 4.12. Límites de detección (L.D.) de As, Ni, Co y Cr en el análisis de contenido metálico en sedimentos y concentración de los blancos ($n_{L.D.}=10$, $n_{blancos}=4$) obtenidos en el proceso de extracción con DTPA

Metal	L.D. ($\mu\text{g/L}$)	Concentración media del blanco \pm S.D. ($\mu\text{g/L}$)
As	2,1	<L.D.
Ni	2,4	<L.D.
Co	0,7	<L.D.
Cr	2,5	<L.D.

Para validar el procedimiento de análisis con DTPA no se encontró ninguna muestra de referencia específica para esta metodología. Así, se procedió a evaluar la validez del método mediante uso de ensayos de recuperación, con los cuales se obtuvieron resultados muy satisfactorios. Los porcentajes de recuperación encontrados estuvieron comprendidos entre un 85 y un 105%.

4.6.4. As, Ni, Co y Cr en muestras biológicas

Antes de proceder a la validación del método, se realizaron 10 blancos de preparación correspondientes a cada uno de los métodos empleados, y se evaluó el límite de detección de la técnica ICP-MS para cada uno de los métodos de digestión ácida asistida por microondas (Tabla 4.13).

Para realizar la validación del análisis de los niveles metálicos en las muestras biológicas se analizaron las siguientes muestras de referencia de la *National Research Council Canada /Conseil national de recherches Canada*: DORM-2 (dogfish muscle Certificated Reference Material for Trace Metals) y DOLT-3 (dogfish liver Certificated Referente Material for Trace Metals). La primera de éstas se empleó para validar el método de digestión de microondas aplicado para los tejidos de músculo y branquias, mientras que la segunda se empleó para validar el método de digestión ácida por microondas utilizado para los tejidos de hígado. Los metales Co y Cr, no están certificados en la muestra DOLT-3 de hígado.

En las Tablas 4.14 y 4.15 se recogen los resultados obtenidos en el análisis de las muestras de referencia biológicas. Como puede observarse se obtuvieron resultados muy adecuados durante la validación, comparables con los valores certificados.

Tabla 4.13. Límites de detección (L.D.) y concentración media y desviación estándar de los blancos de As, Ni, Co y Cr en el análisis de hígado, branquias y músculo por ICP-MS ($n=10$)

Metal	L.D. ($\mu\text{g/L}$)		Concentración media del blanco ($\mu\text{g/L}$)	
	Hígado	Branquias y Músculo	Hígado	Branquias y Músculo
As	0,505	0,472	$1,09 \pm 0,97$	$0,49 \pm 0,20$
Ni	0,243	0,552	<L.D.	<L.D.
Co	0,025	0,084	<L.D.	<L.D.
Cr	0,139	0,285	$0,24 \pm 0,15$	<L.D.

Tabla 4.14. Validación del análisis del contenido metálico en músculo mediante el empleo de la muestra de referencia certificada DORM-2 (dogfish muscle) ($n=9$)

Metal	Valor observado (mg/kg)	Valor certificado (mg/kg)	Recuperación
As	$18,20 \pm 1,37$	$18,0 \pm 1,1$	101,0%
Ni	$18,67 \pm 0,55$	$19,4 \pm 3,1$	96,2%
Co	$0,18 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,03$	96,5%
Cr	$34,30 \pm 0,74$	$34,7 \pm 5,5$	98,8%

Tabla 4.15. Validación del análisis del contenido metálico en hígado mediante el empleo de la muestra de referencia certificada DOLT-3 (dogfish liver) ($n=8$)

Metal	Valor observado (mg/kg)	Valor certificado (mg/kg)	Recuperación
As	$9,79 \pm 0,48$	$10,2 \pm 0,5$	96,0%
Ni	$2,75 \pm 0,06$	$2,72 \pm 0,35$	101,2%
Co	$0,27 \pm 0,01$	-	-
Cr	$4,15 \pm 0,20$	3,5 ^a	-

^a Valores informados en la descripción del material de referencia

4.7. Estudios previos y selección de los puntos de muestreo

La toma de muestras constituye una de las etapas más importantes en el proceso de resolución de problemas analíticos. Así, la forma en como se diseña y ejecuta la toma de muestra determina el grado de adecuación de la interpretación de los resultados finales de un análisis, respecto de los fines establecidos para la población objetivo.

Los grados de significación y fiabilidad de la información a obtener en un sitio potencialmente contaminado están estrechamente relacionados con la adecuación del muestreo a las peculiares características ambientales de cada sitio. Esto es así porque dependiendo del muestreo, el valor estadístico obtenido para cada contaminante reflejará con mayor o menor precisión el valor real existente en el sitio. Por tanto, la selección de los puntos de muestreo es crucial, y de ella depende en gran medida que las decisiones tomadas sobre una zona potencialmente contaminada sean eficaces para abordar y solucionar su problemática.

En el caso de los sistemas naturales, esta etapa adquiere aún más importancia, ya que implica hacerlo bajo ciertos criterios según la información que se desee obtener tanto desde un punto de vista espacial como temporal. Evidentemente, cuanto mayor sea el número de estaciones y frecuencia en que se muestrea, mayor será el nivel de probabilidad que se puede alcanzar en el estudio. Sin embargo, cuanto mayor es el número de muestras recogidas, paralelamente aumenta también el tiempo y coste del análisis, sin que por ello se obtenga, en muchos casos, más información significativamente relevante.

Para la realización de este estudio y la consecución de los objetivos planteados se eligieron en Abril de 2007, 17 puntos de muestreo a lo largo de la costa de la Bahía de Algeciras (Figura 4.10), que previsiblemente representan situaciones distintas de contaminación con características naturales y antropológicas diferentes, y corresponden a la mayor parte del ecosistema. En estos puntos sólo se tomaron muestras de sedimento, con objeto de conocer desde el punto de vista metálico los lugares con niveles más significativos, para posteriormente hacer un estudio integrado en solo cinco puntos, muestreando aguas, sedimentos y peces de forma sistemática.

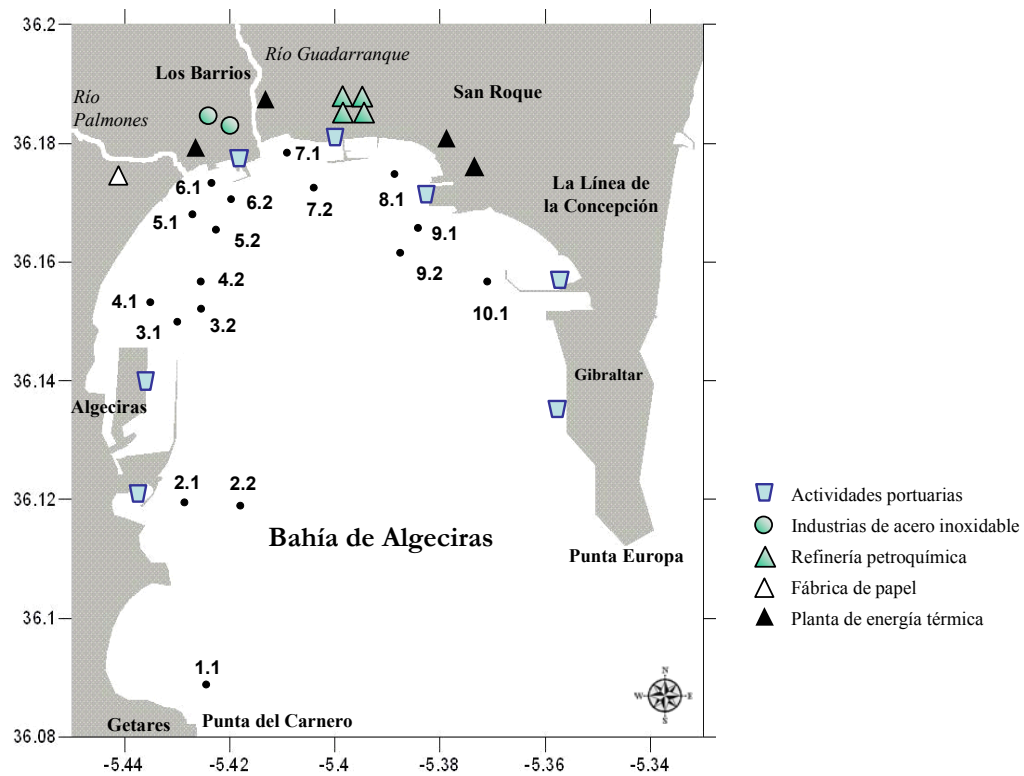


Figura 4.10. Situación geográfica de los puntos de muestreo

Las características de cada punto son las siguientes:

- Punto 1.1: se corresponde con una zona de contaminación prácticamente nula prevista en la playa de Getares, ubicada en una zona muy cercana al Estrecho de Gibraltar, lo cual propicia que sus aguas estén generalmente limpias. Este punto se tomará como punto control.
- Puntos 2.1 y 2.2: es una zona de previsible contaminación urbana frente al muelle de Isla Verde. Se trata de una zona de vertidos de aguas residuales urbanas sin depurar, procedente de la ciudad de Algeciras y con influencia del tráfico marítimo del puerto de Algeciras. En 2007, fecha en la que se comenzaron los estudios presentes en este capítulo, se inició la construcción de una estación depuradora de aguas residuales en esta zona, pero no fue hasta 2011 cuando se puso por primera vez en funcionamiento [Rus Pezzi, 2011]. Por tanto, durante todos los muestreos llevados a cabo en este trabajo, las aguas residuales urbanas procedentes de la ciudad de Algeciras llegaban sin depurar a la bahía.

- Puntos 3.1, 3.2, 4.1 y 4.2: zona cercana también al puerto de Algeciras, con gran influencia del tráfico marítimo, y afectada también por las aguas residuales de la ciudad de Algeciras.
- Puntos 5.1, 5.2, 6.1, 6.2: zona cercana al río Palmones, con influencia industrial, dada su cercanía a la empresa Acerinox (dedicada a la fabricación de aceros inoxidables) y a la central térmica, fluvial procedente del río Palmones y urbana por las ciudades próximas de Los Barrios y Algeciras.
- Puntos 7.1 y 7.2: son puntos, con influencia industrial de la refinería petroquímica Cepsa y la central térmica, urbana y del río Guadarranque.
- Punto 8.1: zona cercana a Puente Mayorga, con influencia portuaria y de la central térmica.
- Punto 9.1, 9.2 y 10.1: zona influenciada por actividades pesqueras y transporte marítimo.

El contenido total de As, Ni, Co y Cr en los sedimentos recogidos en estos puntos de muestreo, así como el porcentaje de materia orgánica encontrado fue analizado y puede observarse en la Figura 4.11. Los datos se encuentran en la Tabla A.1 del Anexo 2.1.

Tal y como indican las gráficas, el porcentaje de materia orgánica en los sedimentos varió entre un 7 y un 15% con un valor medio del 10%, destacando el punto 7.2 con la máxima carga orgánica.

Con respecto al contenido metálico, puede decirse que el cromo es el metal que estaba en mayor abundancia en los sedimentos, seguido del níquel. Además, pudieron identificarse las zonas con más concentración para estos metales: puntos 2.1 para As, 6.1 y 6.2 para Ni y Cr, y 7.1 para Co, localizados alrededor de Isla Verde, Palmones y Guadarranque.

Además del contenido total, se estudió también la concentración de metal más disponible con la finalidad de evaluar la potencial toxicidad de dichos metales. Para ello se utilizaron dos extractantes diferentes: ácido acético (primer paso del método de extracción secuencial BCR) y DTPA+CaCl₂+TEA. Los datos se encuentran en el Anexo 2.2, en las Tablas A.2 y A.3, respectivamente, y pueden observarse en la Figura 4.12.

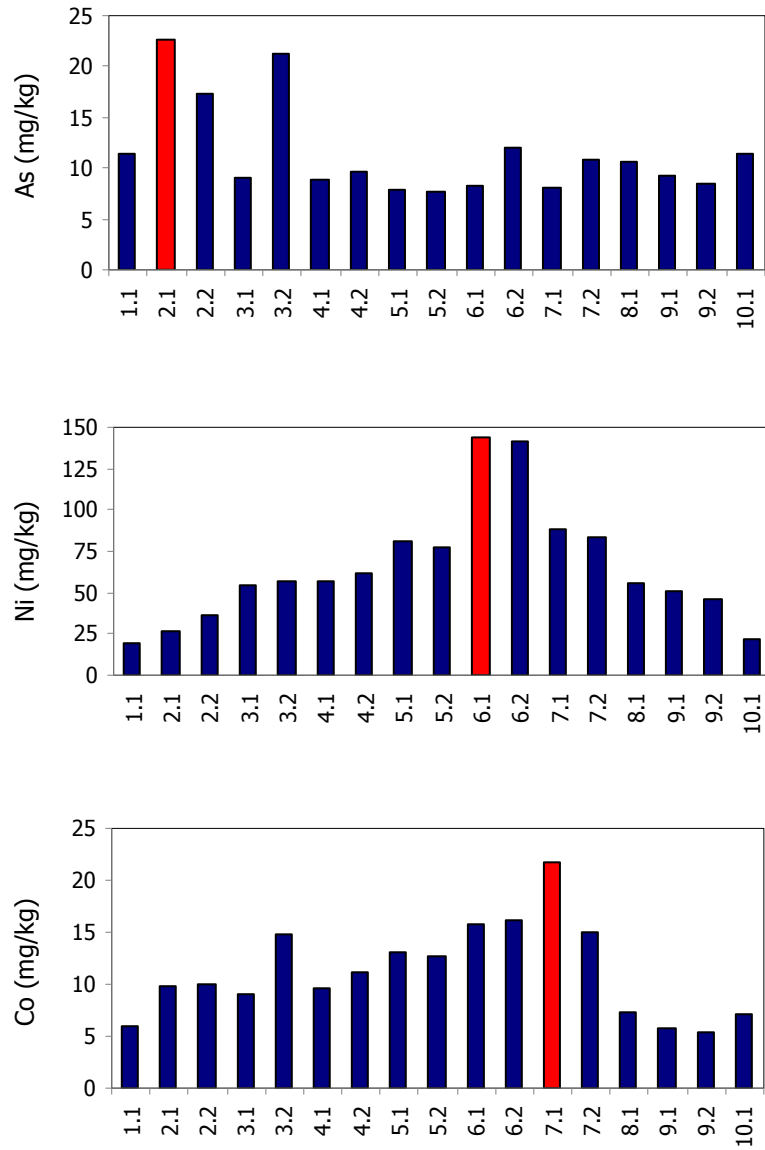


Figura 4.11. Contenido metálico total de As, Ni y Co (mg/kg) en sedimentos muestreados en los 17 puntos de muestreo

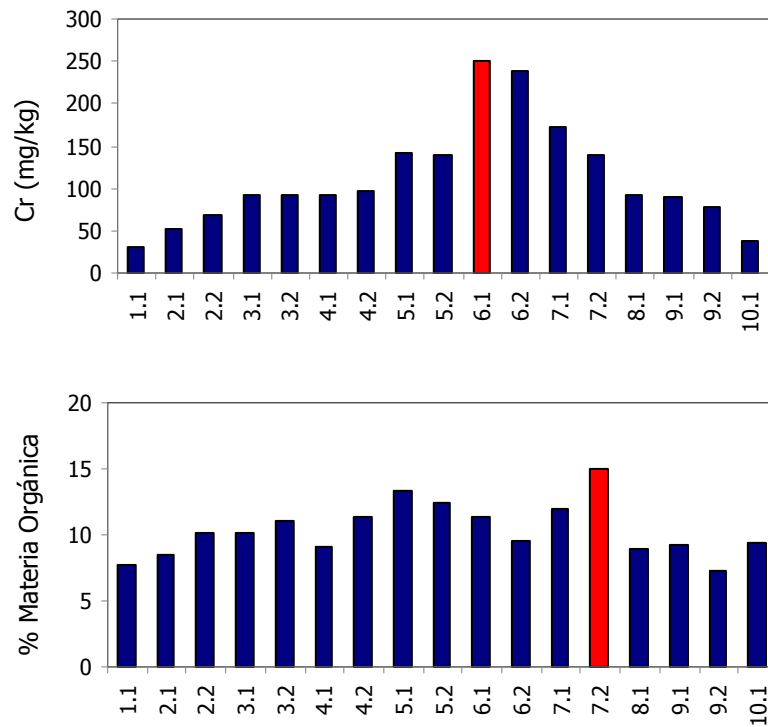


Figura 4.11 (cont.). Contenido metálico total de Cr (mg/kg) y % de materia orgánica en sedimentos muestreados en los 17 puntos de muestreo

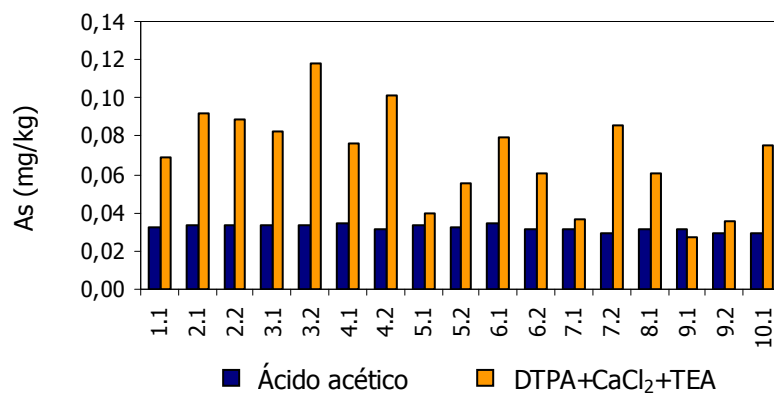


Figura 4.12. Contenido metálico más disponible de As (mg/kg) en los 17 puntos de muestreo obtenido por extracción con ácido acético y DTPA+CaCl₂+TEA

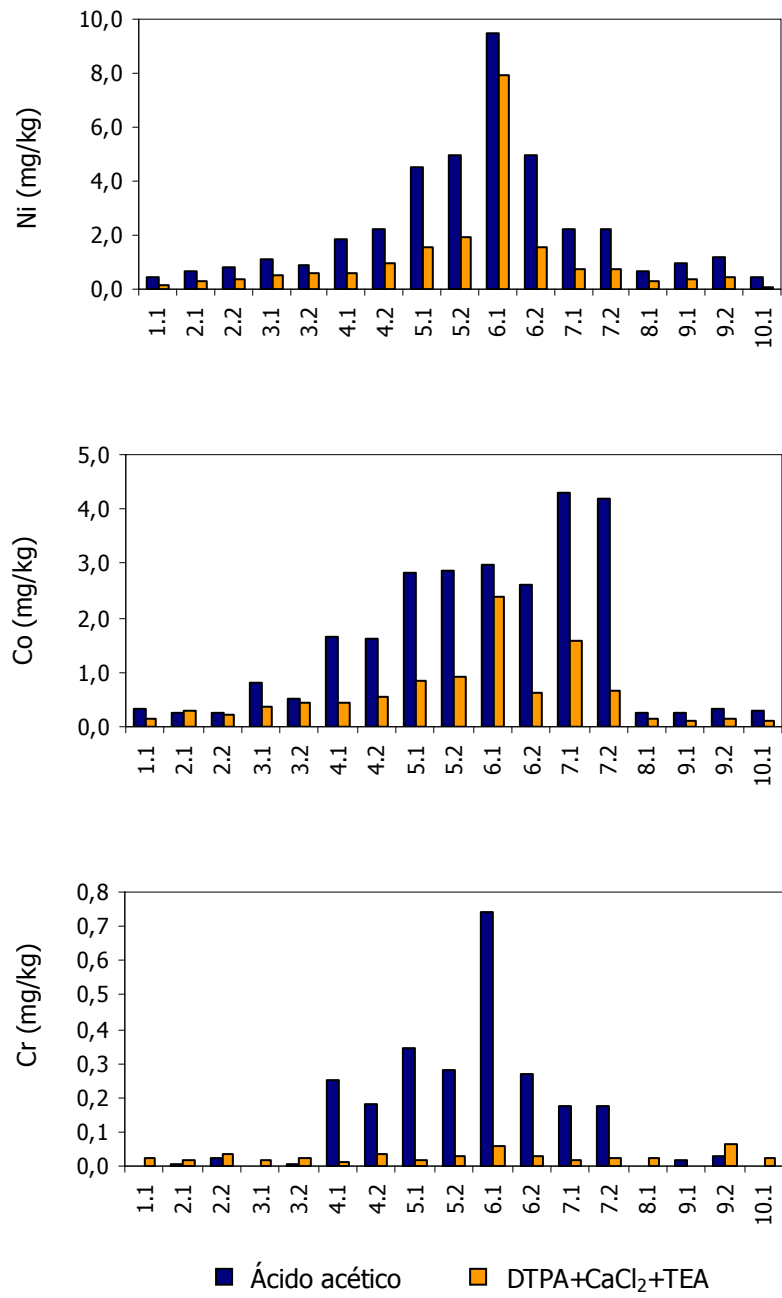


Figura 4.12 (cont.). Contenido metálico más disponible de Ni, Co y Cr (mg/kg) en los 17 puntos de muestreo obtenido por extracción con ácido acético y DTPA+CaCl₂+TEA

El ácido acético resultó ser un extractante más efectivo que el DTPA para la mayoría de los sedimentos recogidos en la Bahía de Algeciras, excepto en el caso del As. Con estos estudios, se comprobó que los puntos con mayor disponibilidad metálica fueron los correspondientes a 6.1 para Ni y Cr y 7.1 y 7.2 para Co.

Así pues, teniendo en cuenta las concentraciones metálicas totales encontradas en los 17 puntos de muestreo, los niveles más disponibles y su disposición geográfica, se eligieron aquéllos 5 que por una u otra razón podían representar mejor el ecosistema, para realizar un estudio más exhaustivo sobre el contenido metálico total y su especiación en muestras de agua, peces y sedimentos. Esta reducción de puntos de muestreo se justifica en base a que los métodos de especiación tanto de aguas como de sedimentos que fueron aplicados son muy laboriosos, por lo que los puntos de muestreo no pueden ser muchos. Estos 5 puntos fueron los siguientes:

P1: Playa de Getares (punto 1.1): punto de control, alejado de la zona central de la bahía, con cierta cantidad de As disponible.

P2: Isla Verde (punto 2.1): punto con la mayor concentración de As total.

P3: Palmones (punto 6.1): punto con los niveles de Ni y Cr total más elevados, y concentraciones de Ni y Cr disponibles muy significativos.

P4: Guadarranque (punto 7.1): punto con la mayor concentración de Co total y nivel de Co disponible.

P5: Puente Mayorga (punto 8.1): punto geográfico significativo por actividad portuaria y cercanía a la central térmica, con una concentración media de As disponible.

En la Figura 4.13 se muestra la localización de dichos puntos de muestreo. Las campañas de toma de muestras se planificaron para estudiar la variabilidad espacio-temporal relacionada con los ciclos biológicos. Así, y después de este muestreo previo, se realizaron cuatro campañas durante dos años consecutivos, tomando las muestras de aguas, sedimentos y peces en el periodo de otoño-invierno y en el de primavera-verano.

En la Tabla 4.16 se recogen la nomenclatura, coordenadas geográficas y muestras tomadas en cada una de los puntos de muestreo seleccionados. En la Tabla 4.17 se indican las fechas en las que se han llevado a cabo las distintas campañas de toma de muestra. En la Figura 4.14 se ilustran los puntos de muestreo en fotografías tomadas desde el barco utilizado en los muestreos.



Figura 4.13. Puntos de muestreo en la Bahía de Argel

Tabla 4.16. Localización geográfica de los puntos de muestreo en la Bahía de Argel

Estaciones de muestreo	Nomenclatura	Coordenadas	
		Norte	Oeste
Playa de Getares	1	36°05'28.31''	5°26'10.93''
Isla Verde	2	36°07'8.43''	5°25'37.60''
Palmones	3	36°10'19.51''	5°25'27.14''
Guadarranque	4	36°10'32.21''	5°24'27.47''
Puente Mayorga	5	36°10'32.23''	5°23'23.24''

Tabla 4.17. Fecha de las campañas de toma de muestra de aguas, sedimentos y peces llevadas a cabo en la Bahía de Algeciras

Campañas	Muestreo de aguas y sedimentos	Muestreo de peces
Muestreo 1	30/10/2007	13/11/2007
Muestreo 2	08/05/2008	30/04/2008
Muestreo 3	04/11/2008	21/10/2008
Muestreo 4	22/05/2009 (aguas) 26/06/2009 (sedimentos)	19/05/2009



Punto de muestro 1: Playa de Getares



Punto de muestro 2: Isla Verde



Punto de muestro 3: Palmones



Punto de muestro 4: Guadarranque

Figura 4.14. Fotos tomadas en los puntos de muestreo desde la embarcación



Punto de muestro 5: Puente Mayorga

Figura 4.14 (cont.). Fotos tomadas en los puntos de muestreo desde la embarcación

4.8. Estudio de los parámetros físico-químicos en la Bahía de Algeciras

Los ciclos meteorológicos, como el régimen de precipitaciones, temperatura, radiación solar y viento, ejercen un efecto muy importante sobre el caudal de los aportes fluviales, composición y producción biológica, lo que a su vez repercute sobre aquellas áreas costeras que reciben estas aguas. La Bahía de Algeciras presenta un clima mediterráneo subtropical en la parte sureste y este, mediterráneo oceánico en la suroeste y mediterráneo semi-continental en el resto, con temperaturas medias anuales de 17 °C [Plan de Calidad Ambiental del Campo de Gibraltar, 2006]. Las precipitaciones registradas durante los años en los que se realizaron los muestreos en la estación de Tarifa, estación meteorológica más próxima a la Bahía de Algeciras, se recogen en la Figura 4.15 [Boletín Hidrológico, <http://servicios2.marm.es/sia/visualizacion/descargas/series.jsp>]. En ella se indican con líneas discontinuas los meses en los que se han realizado los muestreos. Se observa claramente que las precipitaciones tuvieron lugar aproximadamente entre los períodos de noviembre a abril, lo que supone aportes fluviales después del primer y tercer muestreo realizados.

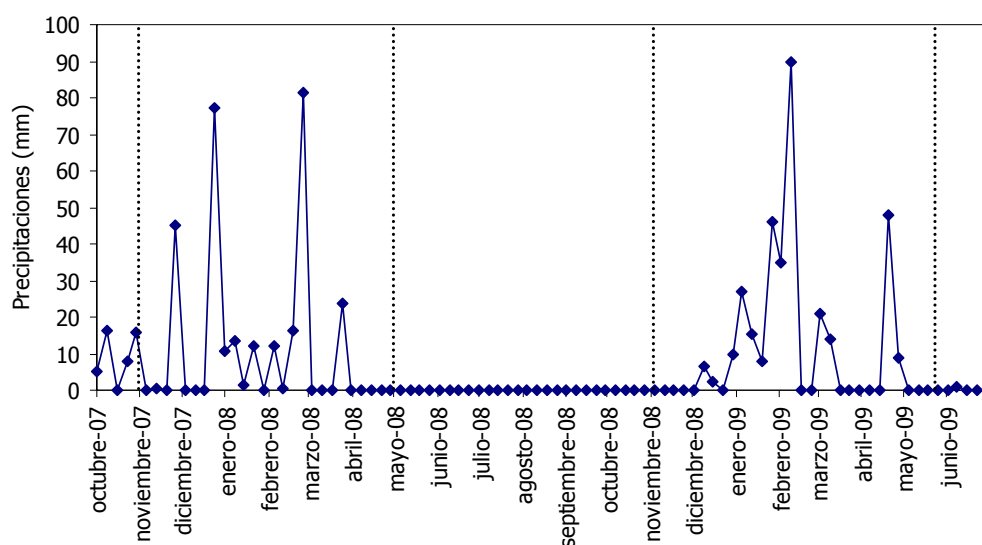


Figura 4.15. Precipitaciones semanales registradas en la estación meteorológica de Tarifa durante el periodo 2007-2009

A continuación se recogen los resultados obtenidos del estudio realizado en el ecosistema acuático de la Bahía de Algeciras, por el cual se determinaron las características físico-químicas de la zona. En el estudio se han diferenciado los parámetros medidos *in situ* durante la toma de muestra y aquellos que se midieron en el laboratorio.

4.8.1. Parámetros medidos *in situ*

Los valores obtenidos de las medidas de los parámetros realizados *in situ* se registraron para todos los muestreos y para cada estación de muestreo (Getares, Isla Verde, Palmones, Guadarranque y Puente Mayorga). Así pues, se estudió la evolución de la temperatura, pH, salinidad, sólidos disueltos totales (TDS), conductividad y oxígeno disuelto en el agua (expresado en mg/L y % de saturación) (Tabla 4.18). Para resumir los datos de manera más sencilla, se representó cada parámetro en las Figuras 4.16, 4.17, 4.18, 4.19, 4.20 y 4.21, respectivamente.

Tabla 4.18. Valores de los parámetros físico-químicos medidos *in situ* en cada uno de los puntos de muestreo

Muestreo	Parámetro	Punto de muestro				
		1	2	3	4	5
1	Temperatura (°C)	21,2	22,1	20,1	21,3	21,0
	pH	8,34	8,27	8,25	8,24	7,03
	Salinidad (‰)	35,6	35,5	37,2	35,2	34,4
	TDS (g/L)	34,4	34,2	36,0	33,9	33,1
	Conductividad (mS/cm)	54,1	53,8	56,4	53,3	52,3
	O ₂ disuelto (mg/L)	4,0	4,1	4,0	4,0	4,1
	O ₂ disuelto (% saturación)	47,7	48,3	43,7	45,2	44,5
2	Temperatura (°C)	18,3	19,7	20,2	20,9	18,9
	pH	8,42	8,42	8,56	8,51	8,58
	Salinidad (‰)	34,8	33,9	32,4	33,8	33,5
	TDS (g/L)	33,8	32,5	31,1	32,5	32,4
	Conductividad (mS/cm)	52,8	51,6	49,6	51,5	51,3
	O ₂ disuelto (mg/L)	6,6	7,0	6,9	6,9	6,9
	O ₂ disuelto (% saturación)	85,8	90,4	88,8	89,6	88,5
3	Temperatura (°C)	14,9	15,9	15,4	15,3	14,3
	pH	7,98	8,03	8,06	8,04	8,07
	Salinidad (‰)	32,9	32,8	32,2	31,2	32,4
	TDS (g/L)	31,7	32,8	32,2	31,2	30,4
	Conductividad (mS/cm)	50,3	51,7	51	49,6	48,5
	O ₂ disuelto (mg/L)	5,7	5,4	4,7	5,3	4,6
	O ₂ disuelto (% saturación)	77,5	75,1	67,7	73,5	66,8
4	Temperatura (°C)	18,2	18,3	18,2	18,6	18,5
	pH	7,11	6,96	7,58	7,37	7,42
	Salinidad (‰)	30,1	29,3	30,3	29,5	29,7
	TDS (g/L)	29,1	28,2	28,9	28,5	28,6
	Conductividad (mS/cm)	47,0	45,4	46,6	45,5	45,6
	O ₂ disuelto (mg/L)	7,5	7,2	7,9	7,5	7,7
	O ₂ disuelto (% saturación)	88,0	83,5	95,5	88,4	94,0

Temperatura

La temperatura es una variable física que influye en los ecosistemas acuáticos, regulando los procesos vitales de los organismos vivos, y afectando a otros parámetros físico-químicos abióticos, como son la solubilidad y el estado físico de nutrientes, solubilidad de gases y de sales, densidad de las aguas, cinética de las reacciones, desplazamientos de equilibrios, etc. Todos ellos son factores que afectan a la distribución, diversidad y actividad metabólica de los seres vivos que integran un ecosistema. Los valores de temperatura dependen fundamentalmente de la absorción de radiación en las capas superficiales y son función de la época del año, la hora del día, la profundidad del medio y el caudal en

cuencas fluviales. La influencia más importante es la disminución de la solubilidad del oxígeno al aumentar la temperatura y la aceleración de los procesos de putrefacción [Orozco-Barrenetxea y col., 2008]

Los datos de temperatura del agua en todas las campañas de muestreo se mantuvieron entre 14,3 y 22,1 °C, no observándose estacionalidad en los resultados. En la campaña de muestreo realizada en otoño de 2008 (muestreo 3) se registraron las temperaturas más bajas en todos los puntos de muestreo, con un valor medio calculado para este muestreo igual a 15 °C. Este descenso de temperaturas era de esperar puesto que según la Agencia Estatal de Meteorología, en el mes de noviembre de 2008 se alcanzaron temperaturas ambientes mucho más frías que en los años anteriores.

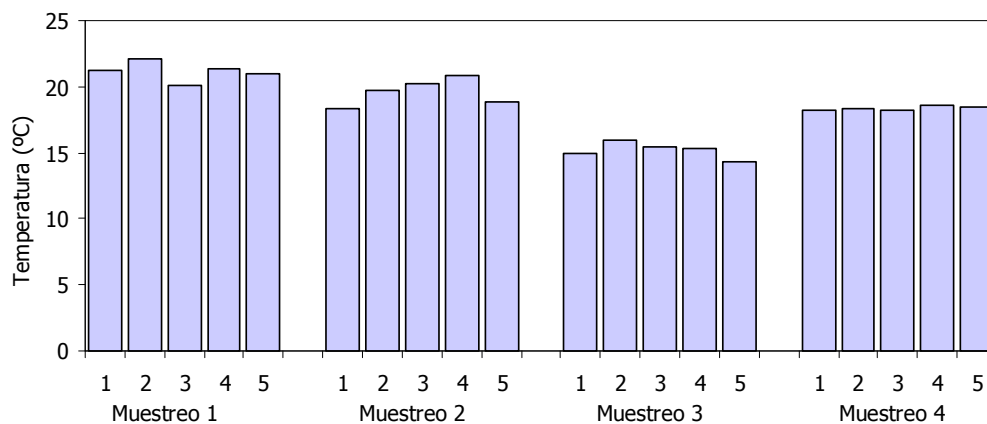


Figura 4.16. Temperatura de las aguas en los puntos de muestreo

pH

El pH de las aguas es otro factor abiótico que se debe tener en cuenta a la hora de determinar la especiación química y la solubilidad de varias sustancias orgánicas e inorgánicas. El pH interviene en procesos biológicos mediados por enzimas (ej. fotosíntesis, respiración); regula la disponibilidad de nutrientes esenciales que limitan el crecimiento microbiano en muchos ecosistemas (ej. NH_4^+ , PO_4^{3-} y Mg^{2+}) e influye en la movilidad de metales pesados. Es por ello que las variaciones bruscas en el pH pueden ocasionar desequilibrios en las comunidades de organismos y provocar cambios en la especiación de los compuestos, muchos de los cuales cambian su efecto o toxicidad sobre los organismos vivos según la especie química en que se encuentren.

El valor de pH en un ecosistema acuático depende fundamentalmente del equilibrio carbónico y de la actividad de los microorganismos presentes. La secuencia de equilibrios de disolución de CO_2 en un agua, y la subsiguiente disolución de carbonatos e insolubilización de bicarbonatos alteran drásticamente el pH. Además, la actividad fotosintética provoca una disminución de la cantidad de CO_2 y un aumento del pH, mientras que la respiración de los organismos heterótrofos aumenta la cantidad de dióxido de carbono y produce una disminución del pH.

En el caso de aguas oceánicas, donde el sistema de amortiguación de carbonato-bicarbonato opera efectivamente, el pH varía dentro de unos límites estrechos (7,5 - 8,4) [Kennish, 1986]. En aguas cercanas a la costa, el pH de agua de mar se puede alejar del valor promedio indicado por efecto de la actividad fotosintética, la respiración celular y el efecto de descargas de origen antropogénico. En zonas donde exista una intensa actividad vegetal, puede llegar a alcanzar valores cercanos a 9, y en zonas donde exista un fuerte consumo de oxígeno y producción de CO_2 , los valores pueden oscilar entre 7,6 y 7,9, e incluso evolucionar hacia pH más ácidos. El pH de lagos alcalinos puede tener valores mayores a 10 u 11, mientras que el pH en algunas ciénagas o pantanos puede ser menores de 4,0. Los valores de pH imperativos establecidos por la Junta de Andalucía para las aguas clasificadas como normales, como las de estos puntos de muestreo, se encuentran entre 6 y 9 (BOJA núm. 27, de 1997).

En la Figura 4.17 se observa que los valores de pH registrados en las aguas se mantuvieron a lo largo del estudio dentro del rango habitual de las aguas naturales, oscilando entre 7,0 y 8,6. Es de destacar que durante la última campaña de muestreo, se detectaron los valores ligeramente más bajos de pH, aunque no se observó variación estacional de forma global.

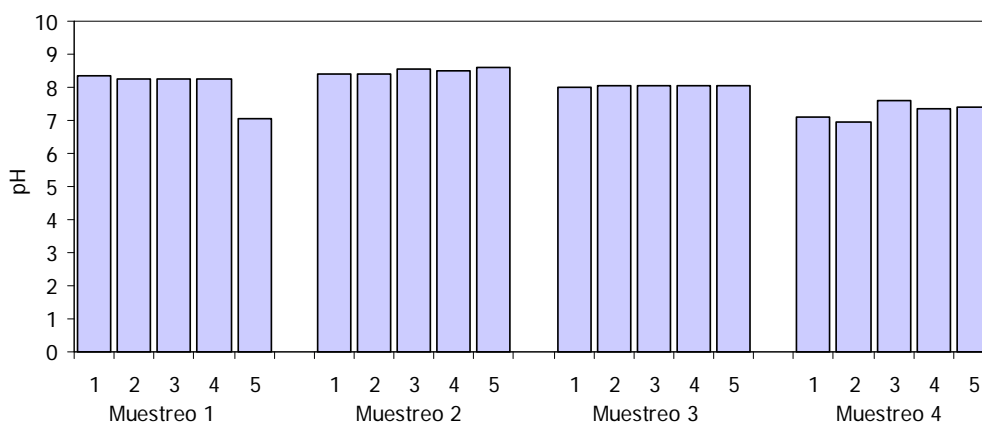


Figura 4.17. Valores de pH de las aguas en los puntos de muestreo

Salinidad, Conductividad y Sólidos disueltos totales

La cantidad de sales que contiene un sistema acuático está relacionada con parámetros como salinidad (en ‰), sólidos disueltos totales (en g/L) o conductividad (en mS/cm). Los sólidos disueltos totales (TDS) son una medida de las sustancias orgánicas e inorgánicas, en forma molecular, ionizada o micro-granular, que contiene el agua. Para considerarse TDS, las sustancias deben ser lo suficientemente pequeñas como para pasar una filtración del tamaño de dos micras. Existe una correlación directa entre los tres términos, de manera que cuanto mayor sean los sólidos disueltos totales o la salinidad, mayor será la conductividad. El valor medio de salinidad en agua de mar es de 35 g/L [Orozco-Barrenetxea y col., 2008].

La Orden de 14 de febrero de 1997 establece objetivos de calidad de estos parámetros en aguas litorales andaluzas, estableciendo un rango de variación que es función de los valores de salinidad/conductividad normales medidos en aguas no afectadas por vertidos y seleccionadas como estaciones de referencia para este fin. En este estudio, la estación considerada de referencia fue el punto de la Playa de Getares, y para aguas consideradas normales, el valor imperativo de conductividad es de 0,9 MN – 1,1 MN, siendo MN la media normal de la conductividad en la zona no afectada por vertidos. Por tanto, a partir de los valores de conductividad del punto de Getares, utilizando los factores 0,9 y 1,1 se definió cada uno de los intervalos de conductividad dentro de los cuales debían de estar los valores de las restantes muestras (Tabla 4.19):

Tabla 4.19. Intervalos de valores imperativos de conductividad según la Orden de 14 de febrero de 1997 tomando como referencia los valores del punto de muestreo de la Playa de Getares

Muestreo	Conductividad x 0,9 (mS/cm)	Conductividad x 1,1 (mS/cm)
1	48,69	59,51
2	47,52	58,08
3	45,27	55,33
4	42,30	51,70

En las Figuras 4.18, 4.19 y 4.20 se registraron los valores correspondientes al contenido salino, en forma de salinidad, sólidos disueltos totales y conductividad, respectivamente. No se observaron diferencias importantes entre las distintas estaciones de muestreo y las cuatro campañas de muestreo realizadas, siendo los valores medios de salinidad, sólidos disueltos totales y conductividad próximos a 33‰, 33 g/L y 50 mS/cm,

respectivamente. Estos valores se encuentran dentro de los rangos habituales para aguas naturales. Cabe señalar que en el último muestreo realizado se obtuvieron los valores más bajos, con una media de 30‰, 30 g/L y 46 mS/cm. En todos los muestreos, los datos de conductividad estuvieron dentro de los valores imperativos establecidos por la Junta de Andalucía para aguas clasificadas como normales, indicados en la Tabla 4.19.

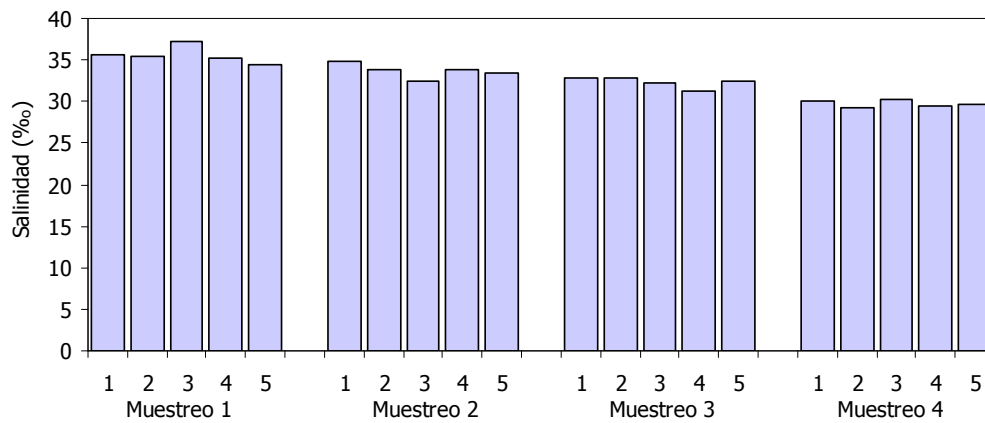


Figura 4.18. Valores de salinidad de las aguas en los puntos de muestreo

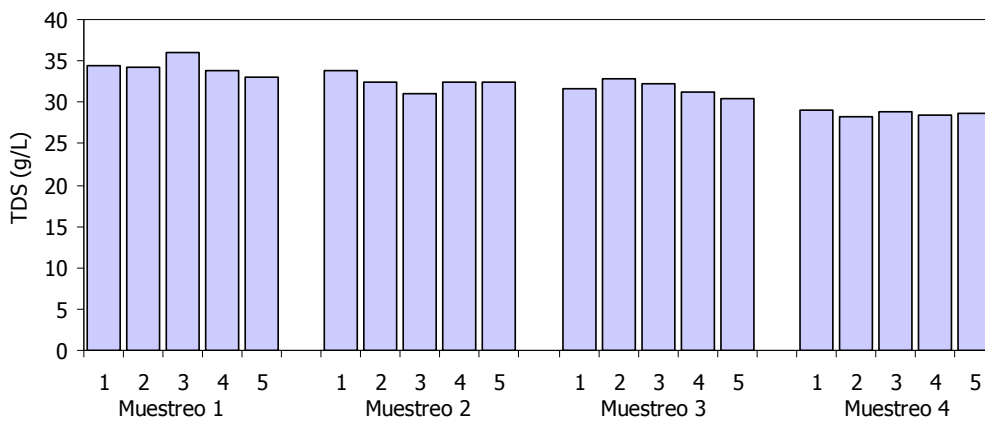


Figura 4.19. Valores de sólidos totales disueltos de las aguas en los puntos de muestreo

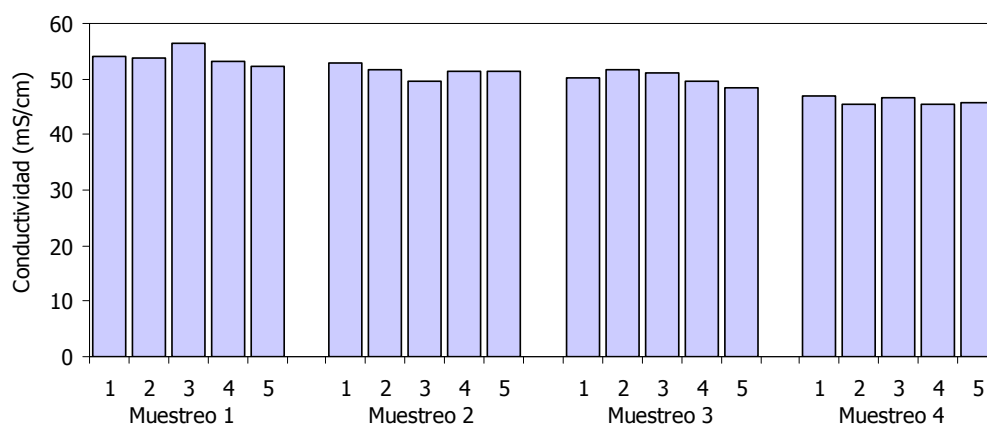


Figura 4.20. Valores de conductividad de las aguas en los puntos de muestreo

Oxígeno disuelto

Históricamente, el oxígeno disuelto ha sido el parámetro de mayor interés en el estudio de calidad de aguas. Entre los gases disueltos, el oxígeno es el que juega el papel más importante en la calidad biótica de las aguas, puesto que es indispensable para la respiración de los organismos, facilita la degradación de la materia orgánica e interviene en la realización de los ciclos bioquímicos. El oxígeno es un gas muy relevante en la dinámica de aguas, su solubilidad depende de varios factores, como la temperatura, presión, coeficiente de solubilidad, tensión de vapor, salinidad y composición fisicoquímica del agua. El porcentaje de saturación depende de la turbulencia, de la superficie de contacto entre gas y agua y de su contenido salino, estando inversamente relacionado con la temperatura y salinidad. Las aguas corrientes superficiales no contaminadas suelen estar saturadas de oxígeno, con una concentración de oxígeno disuelto entre 6,5 y 8 mg/L. Valores más bajos pueden indicar presencia de contaminación por materia orgánica, puesto que la descomposición bacteriana de la misma implica una demanda de oxígeno disuelto. En este caso, las aguas se vuelven sépticas y de mala calidad para la vida de algunas especies acuáticas. Concentraciones por debajo de 5 mg/L pueden afectar al desarrollo de las comunidades, y por debajo de 2 mg/L pueden llevar a la muerte de los peces e invertebrados bentónicos.

La legislación ambiental andaluza establece los objetivos de calidad de este parámetro en términos de porcentaje de saturación, de forma que para aguas normales el valor imperativo de oxígeno disuelto es de 70%.

En la Figura 4.21 se muestran los valores de oxígeno disuelto en las aguas muestreadas y se observa una mayor variabilidad de este parámetro entre muestreos, destacando la baja cantidad de O_2 disuelto en los muestreos 1 y 3, que se corresponden con la estación de otoño, previa a las precipitaciones en la zona. De este modo los valores medios de oxígeno disuelto obtenidos del muestreo primero al cuarto fueron $4,05 \pm 0,04$; $6,84 \pm 0,18$; $5,13 \pm 0,48$ y $7,56 \pm 0,27$, expresados en mg/L, y $45,9 \pm 2,0$, $88,6 \pm 1,7$, $72,1 \pm 4,7$ y $89,9 \pm 4,9$, en % de saturación. Como se deduce de estos valores, el oxígeno disuelto tiene una tendencia estacional en las aguas de la Bahía de Algeciras, siendo su contenido mayor en los meses de primavera. Estos datos se encuentran en consonancia con los publicados anteriormente [Plan de calidad ambiental del campo de Gibraltar, 2005], según los cuales los máximos de los procesos fotosintéticos en las costas de la Bahía de Algeciras se producen fundamentalmente en la época estival, fundamentalmente de abril a julio. Los valores de oxígeno disuelto en todas las estaciones de muestreo durante el muestreo 1 y en algunas en el muestreo 3 están por debajo del valor imperativo establecido por la Junta de Andalucía. Estas concentraciones tan bajas de oxígeno en los muestreos 1 y 3 indican procesos de degradación de materia orgánica, con cierta hipoxia en las aguas.

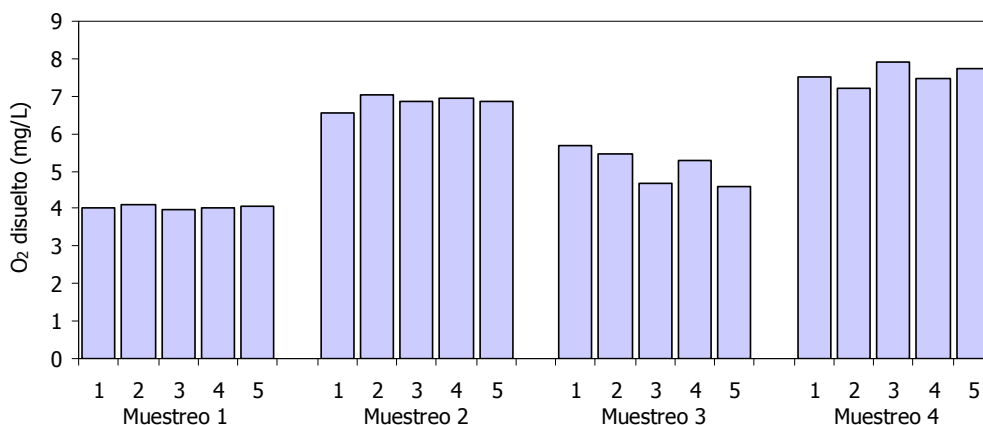


Figura 4.21. Valores de oxígeno disuelto de las aguas en los puntos de muestreo

4.8.2. Parámetros generales

Además de los parámetros físico-químicos que se midieron *in situ*, también se realizaron las medidas en el laboratorio de la materia en suspensión en las aguas y su contenido orgánico, el carbono orgánico disuelto, y el contenido de materia orgánica en los sedimentos. Los resultados se muestran en la Tabla 4.20. Además, se representó cada parámetro en las Figuras 4.22, 4.23, 4.24 y 4.25.

Tabla 4.20. Valores de materia en suspensión y contenido orgánico en aguas y sedimentos

Muestreo	Parámetro	Punto de muestro				
		1	2	3	4	5
1	Materia en suspensión en agua (g/L)	0,027	0,024	0,024	0,032	0,040
	Materia orgánica en materia en suspensión (%)	32,9	17,2	26,5	25,7	35,0
	COD en agua (mg/L)	1,72	1,52	1,39	1,53	6,23
	Materia orgánica en los sedimentos (%)	16,1	17,8	12,3	11,6	10,2
2	Materia en suspensión en agua (g/L)	0,014	0,015	0,016	0,015	0,016
	Materia orgánica en materia en suspensión (%)	12,8	18,2	13,4	20,2	19,0
	COD en agua (mg/L)	0,41	0,59	0,67	0,72	0,56
	Materia orgánica en los sedimentos (%)	2,6	5,3	1,8	1,7	1,5
3	Materia en suspensión en agua (g/L)	0,029	0,017	0,022	0,024	0,019
	Materia orgánica en materia en suspensión (%)	19,4	12,6	17,9	21,4	17,8
	COD en agua (mg/L)	1,74	1,03	0,66	1,67	1,52
	Materia orgánica en los sedimentos (%)	4,1	7,6	6,8	7,6	15,7
4	Materia en suspensión en agua (g/L)	0,021	0,022	0,023	0,022	0,020
	Materia orgánica en materia en suspensión (%)	12,8	16,1	14,6	12,6	7,1
	COD en agua (mg/L)	0,92	2,51	0,41	1,05	1,14
	Materia orgánica en los sedimentos (%)	3,1	5,7	2,4	4,5	4,4

Materia en suspensión

La materia en suspensión, o sólidos en suspensión (SS), es un parámetro descriptivo de la materia particulada, orgánica e inorgánica, presente en el agua. Se definen los sólidos en suspensión como la porción de sólidos retenidos por un filtro de tamaño de poro de 0,45 µm que posteriormente se seca a 103-105°C hasta peso constante [Orozco-Barrenetxea y

col., 2008]. La presencia de material en suspensión en agua de mar puede deberse tanto a causas antropogénicas (como la presencia de vertidos de diferente naturaleza, sólidos flotantes, etc.) como a fuentes naturales (como partículas de sedimento, microorganismos, etc.).

La normativa andaluza establece objetivos de calidad de este parámetro respecto a valores medios de una zona considerada como referencia, la cual no debe estar afectada por vertidos. Para aguas consideradas normales, el valor imperativo de sólidos en suspensión, es de 1,2 MN, siendo MN el valor medio en aguas no afectadas por los vertidos, que como se ha indicado en este estudio fue el punto de muestreo de la Playa de Getares.

En la Figura 4.22 se muestran los datos de sólidos en suspensión para las diferentes campañas y puntos de muestreo. La carga de sólidos en suspensión observadas en las estaciones de la Bahía de Algeciras se mantiene dentro del intervalo de 0,014 a 0,04 g/L. El contenido de materia suspendida fue similar al encontrado en sistemas acuáticos próximos como la Bahía de Cádiz [Vicente-Martorell y col., 2009], estando en todos los casos alrededor de 0,025 g/L. Durante el primer muestreo se obtuvieron los mayores valores de materia en suspensión, siendo sin embargo, el muestreo segundo el que presentó los valores más pequeños (0,015 g/L). En todos los casos los datos respetan los valores imperativos establecidos por la Junta de Andalucía, excepto la estación de Puente Mayorga durante el muestreo 1, cuyo valor de sólidos en suspensión es de 1,48 veces el valor de MN.

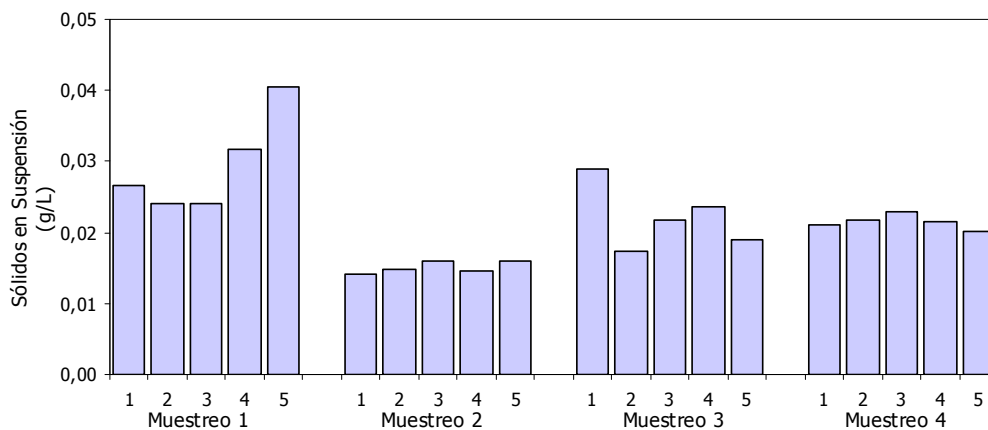


Figura 4.22. Contenido de sólidos en suspensión de las aguas en los puntos de muestreo

Materia orgánica en la materia en suspensión

El contenido en materia orgánica tiene una tendencia algo similar a la materia en suspensión (Figura 4.23), con valores mayores en el primer muestreo (valor medio de 27,4%); el menor contenido de materia orgánica se observó en el cuarto muestreo con una media de 12,7%, siendo el contenido medio de materia orgánica en los muestreos segundo y tercero de 16,7 y 17,8%, respectivamente. A su vez, estos datos coincidieron de forma inversa con la tendencia observada para el oxígeno disuelto. En el muestreo 1 se obtuvieron los mínimos valores de este parámetro, lo que podría ser debido a la presencia de una mayor cantidad de materia orgánica. Por lo contrario, en el muestreo 4 fue donde se obtuvieron los niveles mayores de oxígeno disuelto, asociado a una menor contaminación por materia orgánica. El contenido de materia orgánica fue similar al encontrado en sistemas acuáticos próximos como la Bahía de Cádiz [Vicente-Martorell y col., 2009].

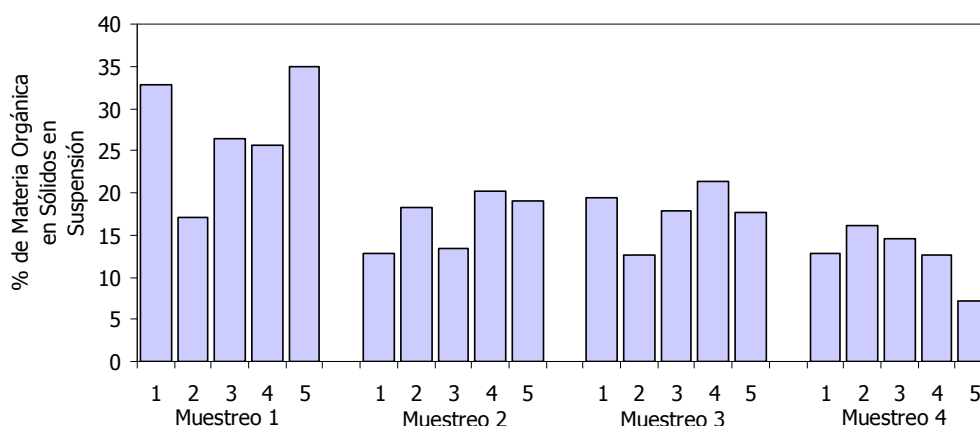


Figura 4.23. Contenido de materia orgánica en los sólidos en suspensión de las aguas en los puntos de muestreo

Carbono orgánico disuelto

El contenido en carbono orgánico disuelto fue también analizado sobre las muestras de agua filtradas. Este parámetro varió entre 0,41 y 6,23 mg/L, con el siguiente comportamiento: muestreo 1 > muestreo 3 > muestreo 4 > muestreo 2 (Figura 4.24). Entre puntos de muestreo el comportamiento no fue muy diferente, con la excepción de las muestras de Puente Mayorga e Isla Verde con valores más destacados que los restantes en el primer muestreo (valor más alto de COD de 6,23 mg/L) y en el último (valor de COD de

2,51 mg/L), respectivamente. El valor de COD en Puente Mayorga en el primer muestreo supera incluso el valor imperativo del parámetro carbono orgánico total, establecido como 3 mg/L para aguas normales. Exceptuando este punto de muestreo, los restantes valores fueron similares al encontrado en sistemas acuáticos próximos como la Bahía de Cádiz [Carrasco y col., 2003].

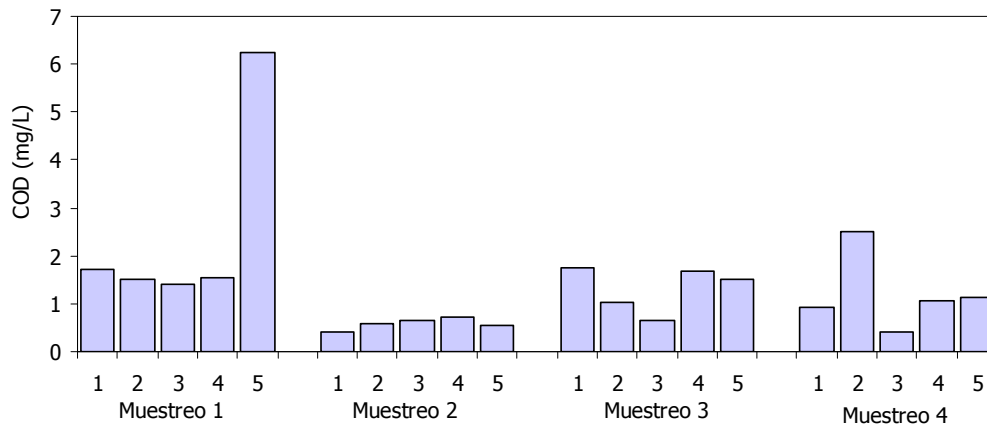


Figura 4.24. Contenido de carbono orgánico disuelto de las aguas en los puntos de muestreo

Materia orgánica en sedimentos

La materia orgánica en los sedimentos es un parámetro muy significativo para la evaluación de la toxicidad de los sedimentos, puesto que juega un papel importante en la disponibilidad de los contaminantes tanto orgánicos como inorgánicos en los sedimentos. Además, la materia orgánica tiene una fuerte influencia en las propiedades químicas y físicas de los sedimentos, como su capacidad de retención de aguas, capacidad de intercambio iónico, etc. Una de sus principales características es que la materia orgánica puede interactuar con la arcilla, iones metálicos, óxidos e hidróxidos para formar asociaciones solubles o insolubles, que influirán en la biodisponibilidad de los metales asociados a los sedimentos [Rosas Rodríguez, 2001].

En la Figura 4.25 se ha representado el porcentaje de materia orgánica de los sedimentos, para todas las campañas y todas las estaciones de muestreo. Se puede observar que el porcentaje de materia orgánica fue mayor en el primer y tercer muestreo, correspondiendo con la estación de otoño, después de la actividad biológica del verano,

oscilando entre 4,1 y 17,8%, Los datos en primavera fueron menores, entre 1,5 y 5,7%, estando comprendidos dentro de los valores normales en sedimentos de este tipo de ecosistemas [Carrasco y col., 2003; Vicente-Martorell y col., 2009].

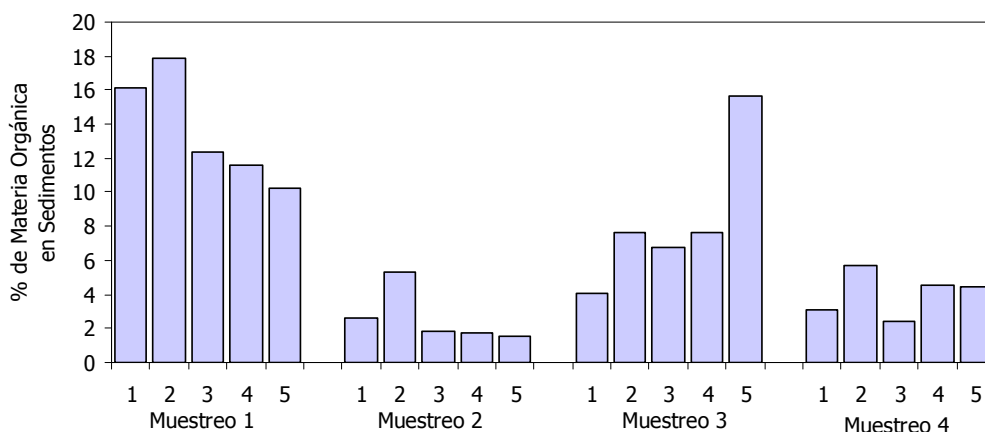


Figura 4.25. Contenido de materia orgánica de los sedimentos en los puntos de muestreo

Para definir mejor el ecosistema, se estudió la existencia de posibles correlaciones entre todos los parámetros físico-químicos observados en la Bahía de Algeciras. Una vez caracterizadas las distribuciones de estas variables como no paramétricas, se empleó la correlación de Spearman, obteniéndose correlaciones positivas y significativas ($p < 0,05$; R Spearman $> 0,7$) para salinidad, sólidos disueltos totales y conductividad, evidenciando el carácter salino del ecosistema. El oxígeno disuelto correlacionó negativamente con la salinidad, sólidos disueltos totales y conductividad, no haciéndolo con el contenido orgánico como se comentó en el análisis de la tendencia de los resultados obtenidos. Así, el COD correlacionó positivamente con los sólidos en suspensión, el % de materia orgánica en los sólidos en suspensión y el % de materia orgánica en sedimentos.

4.9. Distribución y biodisponibilidad de As, Ni, Co y Cr en la Bahía de Algeciras

A continuación se detallan los niveles metálicos de As, Ni, Co y Cr en las aguas, sedimentos y tejidos de peces de la Bahía de Algeciras. Asimismo, también se estudia la

especiación metálica con objeto de definir la potencial disponibilidad hacia la biota, evaluando además las posibles influencias estacionales y espaciales que pudieran existir.

4.9.1. Contenido metálico en agua

La distribución de metales en el medio acuático se encuentra controlada por procesos naturales, como pueden ser las aportaciones atmosféricas o de los ríos, erosión de los suelos, actividades biológicas, drenaje de aguas, y por actividades antropogénicas, como la descarga de aguas residuales urbanas e industriales [Carman y col., 2007]. Además, su biodisponibilidad para los organismos acuáticos depende en gran medida de las formas químicas en que se encuentren. Es por ello que se ha decidido realizar el estudio no sólo de las concentraciones metálicas totales sino también de sus especies químicas en las aguas.

4.9.1.1. Concentración total en agua

Tal y como se ha indicado en la metodología de análisis de aguas, se realizó el estudio de la concentración metálica total en aguas, y se diferenció entre el metal disuelto, que es más disponible, y el metal particulado. Los valores de concentración total, concentración disuelta y concentración en la materia en suspensión, de los metales As, Ni, Co y Cr en las aguas se encuentran en las Tablas A.5, A.6, A.7 y A.8 del Anexo 4.1.

Las concentraciones totales se encuentran dentro de los intervalos siguientes: As: 0,494 – 0,795 µg/L; Ni: 0,137 – 0,574 µg/L; Co: 0,022 – 0,752 µg/L y Cr: 0,200 – 0,555 µg/L (Figura 4.26). Los valores medios de metales encontradas son los siguientes: As: 0,6±0,1 µg/L, Ni: 0,3±0,1 µg/L, Co: 0,1±0,2 µg/L y Cr: 0,4±0,1 µg/L. Así, se pueden ordenar de mayor a menor concentración media como [As]> [Cr] > [Ni] > [Co].

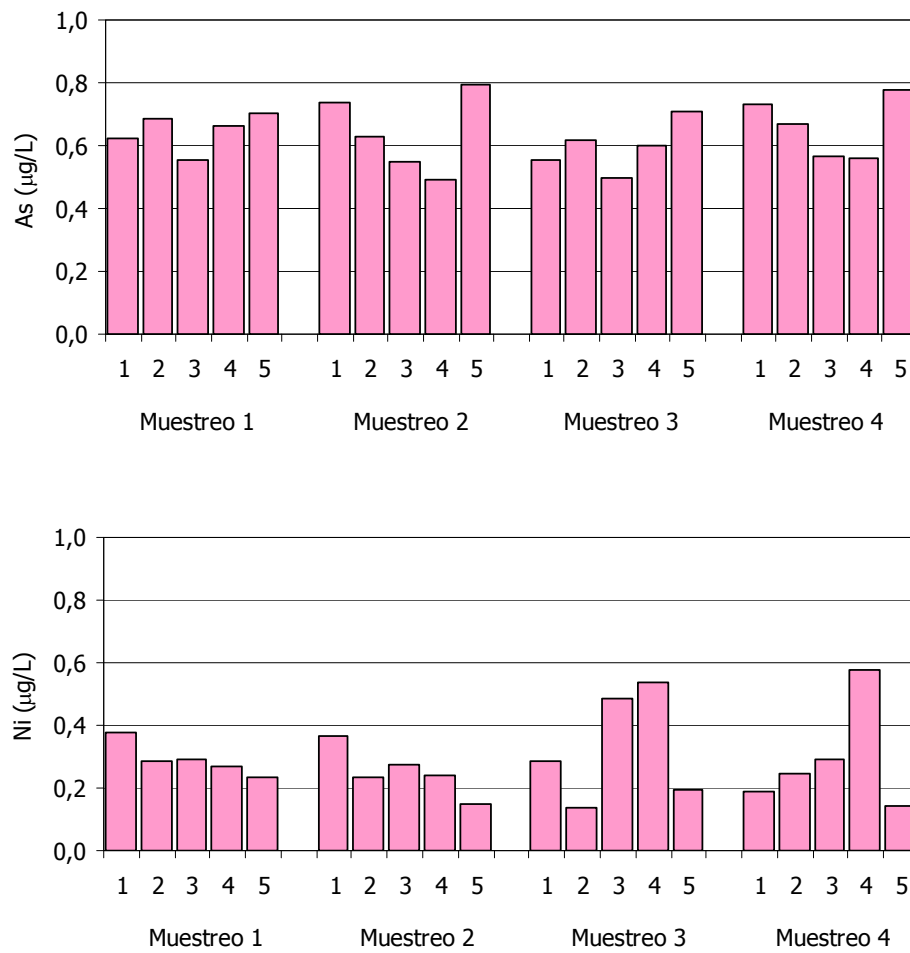


Figura 4.26. Concentración total de As y Ni en aguas en las 5 estaciones de la Bahía de Algeciras

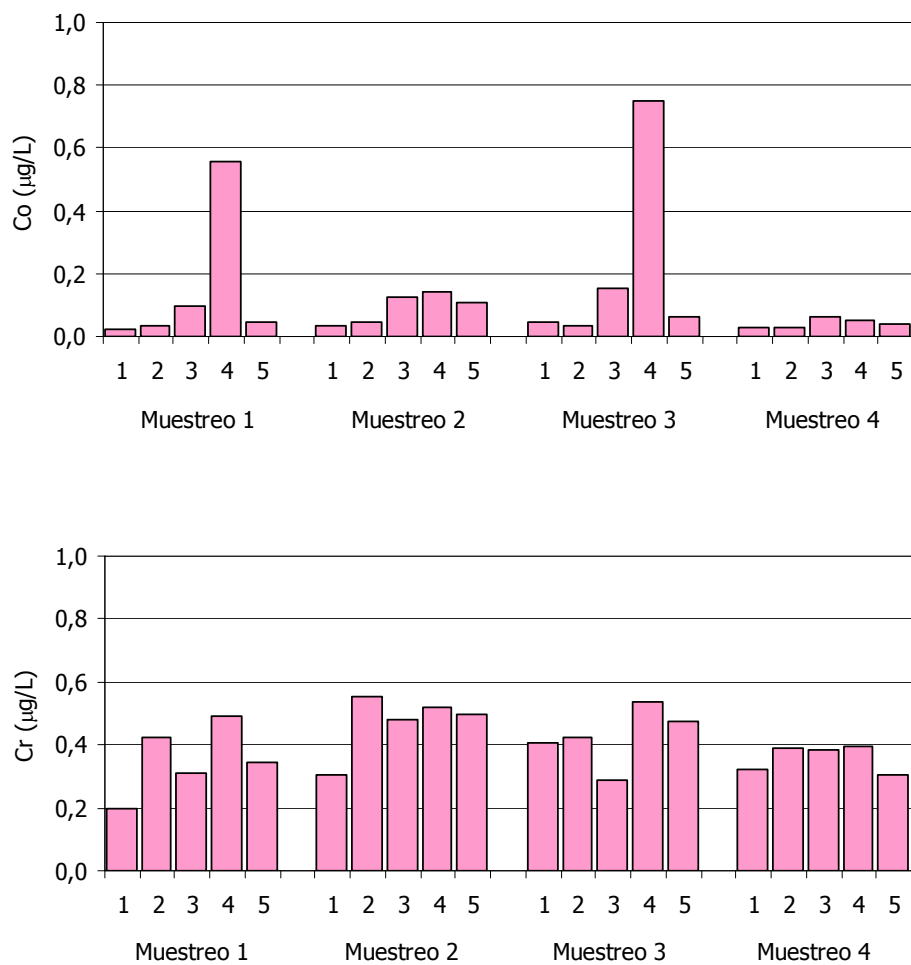


Figura 4.26 (cont.). Concentración total de Co y Cr en aguas en las 5 estaciones de la Bahía de Algeciras

En el caso del As, los niveles se encontraron entre 0,494 y 0,795 µg/L, existiendo pequeñas variaciones entre los puntos de muestreo, destacando la estación de Puente Mayorga con valores ligeramente superiores en el muestreo segundo y cuarto.

Los valores de Ni total analizados en las muestras de aguas estuvieron dentro del rango 0,137 y 0,574 µg/L. De ellos puede decirse que no existe mucha diferencia entre las estaciones de muestreo durante las dos primeras campañas. Sin embargo hay que destacar

la presencia de mayores valores de Ni en las estaciones de Palmones y Guadarranque en el muestreo 3, así como en la estación de Guadarranque en el muestreo 4. El nivel de Ni en estos puntos puede ser debido a la presencia cercana de la empresa Acerinox y a la Refinería Cepsa. El punto 1 (Playa de Getares) fue catalogado inicialmente como punto limpio y de control, pero presentó los valores de Ni más altos en los dos primeros muestreos. Es posible que esto sea debido al accidente que sufrió el buque frigorífico Sierra Nava en enero de 2007 provocando un derrame de 170 toneladas de fuel a 20 metros de la costa de la Playa de Getares. Siete meses después, el chatarrero New Flame naufragó tras chocar con un petrolero y se partió por la mitad, derramando igualmente el contenido de sus tanques. Por ello, en octubre de 2007 (primera campaña de muestreo) los niveles de Ni fueron mayores que los esperados, pero han ido disminuyendo progresivamente durante los siguientes muestreos dado el alto grado de renovación de aguas que existe en la Bahía de Algeciras y las labores de limpieza que se llevaron a cabo en la zona. Portella y col. han descrito la presencia de niveles elevados de Ni(II), Fe(II) y V(IV) en fuel [Portella y col., 2006].

Respecto a las concentraciones de Co total, los datos estuvieron comprendidos entre 0,022 y 0,153 $\mu\text{g/L}$, excepto en la estación de Guadarranque donde cabe destacar el alto nivel de Co (alrededor de 0,6 y 0,8 $\mu\text{g/L}$ en los muestreos 1 y 3, respectivamente). Es posible que sea debido a un vertido puntual de la refinería.

En el caso de los niveles de Cr, los valores, comprendidos entre 0,200 y 0,555 $\mu\text{g/L}$, indican que los niveles de metal total tuvieron una tendencia a ser mayores en los puntos de Isla Verde y Guadarranque, excepto en el cuarto muestreo donde se igualan los valores en las estaciones de Isla Verde, Palmones y Guadarranque. Parece ser que son estos puntos los que de una forma más o menos variable presentaron niveles de este metal significativos.

Con objeto de estudiar la influencia estacional y espacial que puedan presentar los metales en las aguas de la Bahía de Algeciras se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados obtenidos. Así, se observó que para ningún metal existía diferencia significativa entre los diferentes muestreos llevados a cabo, ni existía influencia estacional para un valor de $p < 0,05$. Sin embargo, y tras el estudio no paramétrico de Kruskal-Wallis sí se encontraron diferencias significativas entre los puntos de muestreo para As ($p = 0,0144$) y Co ($p = 0,0052$). Así, en el caso del As, y mediante el test de comparación múltiple se observaron diferencias significativas entre los puntos 3 (Palmones) y 5 (Puente Mayorga), y para el caso del Co, se encontraron entre los puntos 1 (Getares) y 4 (Guadarranque).

Con respecto a las relaciones entre metales puede decirse que se observaron correlaciones negativas entre el As y el Ni ($R = -0,5422$; $p = 0,014$), y entre el Cr y el Co ($R = -0,5748$; $p = 0,008$). Aún así, los coeficientes de correlación no fueron muy elevados.

Igualmente, se estudió si existía relación entre el contenido metálico total en las aguas y los parámetros físico-químicos, encontrándose que ninguno de los metales estaba relacionado con estos parámetros. Esto indicó que el comportamiento de los metales en la bahía no parecía estar influenciado por procesos asociados a estos parámetros.

Comparando estos valores de concentración total metálica en aguas con los encontrados en otros ecosistemas acuáticos, se puede decir que:

- Los valores de concentración de As en las aguas de la Bahía de Algeciras son similares a las concentraciones observadas en la Bahía de Cádiz (zona menos industrializada), donde los valores variaban en el rango 0,16-1,96 $\mu\text{g/L}$. Sin embargo, están por debajo de los niveles encontrados en la Ría de Huelva (conocido como uno de los estuarios más contaminados de Europa por metales pesados), en donde el As se halla en el intervalo 2,6-9,3 $\mu\text{g/L}$ [Vicente Martorell, 2010].

- Los valores de Ni se encuentran por debajo de los observados en la Ría de Huelva, en donde el Ni estaba comprendido entre 2,1 y 13 $\mu\text{g/L}$ [Morillo y Usero, 2008]. Además, estos autores también estudiaron las concentraciones de Ni en aguas de la Bahía de Algeciras durante el primer semestre del año 2007, encontrando valores de 0,4-1 $\mu\text{g/L}$, ligeramente superiores a los encontrados en este estudio.

- Los valores de Co se encuentran dentro de los encontrados en otros ecosistemas, como el estuario del Río Hudson en Estados Unidos, donde los valores de Co totales en aguas se encuentran entre 0,028 y 3,231 $\mu\text{g/L}$, y los de la Bahía de San Francisco, en Estados Unidos, donde oscilan entre 0,027 y 4,235 $\mu\text{g/L}$ [Tovar-Sánchez y col., 2004]. También se han analizado los valores de Co disuelto y particulado en toda la costa de Portugal, resultando que el Co total en la zona del estuario del Río Guadiana oscila entre los valores 0,0326 y 0,194 $\mu\text{g/L}$ [Santos-Echeandía y col., 2012], valores muy similares a los encontrados en este estudio.

- Con respecto al Cr, no se han encontrado en la bibliografía datos concentraciones totales en aguas, sino en la fracción disuelta. En la siguiente sección se explicará la distribución metálica entre las fases disueltas y particuladas. Los datos encontrados en la Bahía de Algeciras de Cr disuelto estuvieron comprendidos entre 0,096 y 0,346 $\mu\text{g/L}$. En otros ecosistemas, como el estuario del Río Severn y el canal de Bristol (Reino Unido) se han encontrado concentraciones de Cr disuelto entre 0,5 y 3,5 $\mu\text{g/L}$, según la salinidad. Así, para zonas más lejanas al estuario con salinidad de 30‰ los valores medios encontrados fueron de 0,5 $\mu\text{g/L}$ [Jonas y Millward, 2010], similares a los hallados en este estudio. En el golfo de Tailandia por ejemplo, los valores de Cr variaron entre 0,002 y 0,719 $\mu\text{g/L}$ [Censi y col., 2006] y en la Bahía de Florida estuvieron comprendidos entre 0,031 y 0,421 $\mu\text{g/L}$ [Caccia y Millero, 2003]. Todos ellos son valores muy similares a las concentraciones encontradas en la Bahía de Algeciras durante este estudio.

4.9.1.2. Distribución metálica entre la fase disuelta y particulada

El esquema de especiación utilizado permite realizar una primera distinción entre los niveles metálicos en la fracción disuelta y en la particulada, considerándose esta última como la fase menos disponible para la biota. El porcentaje de distribución de los metales analizados entre la fase disuelta y particulada en porcentaje se muestra en la Figura 4.27.

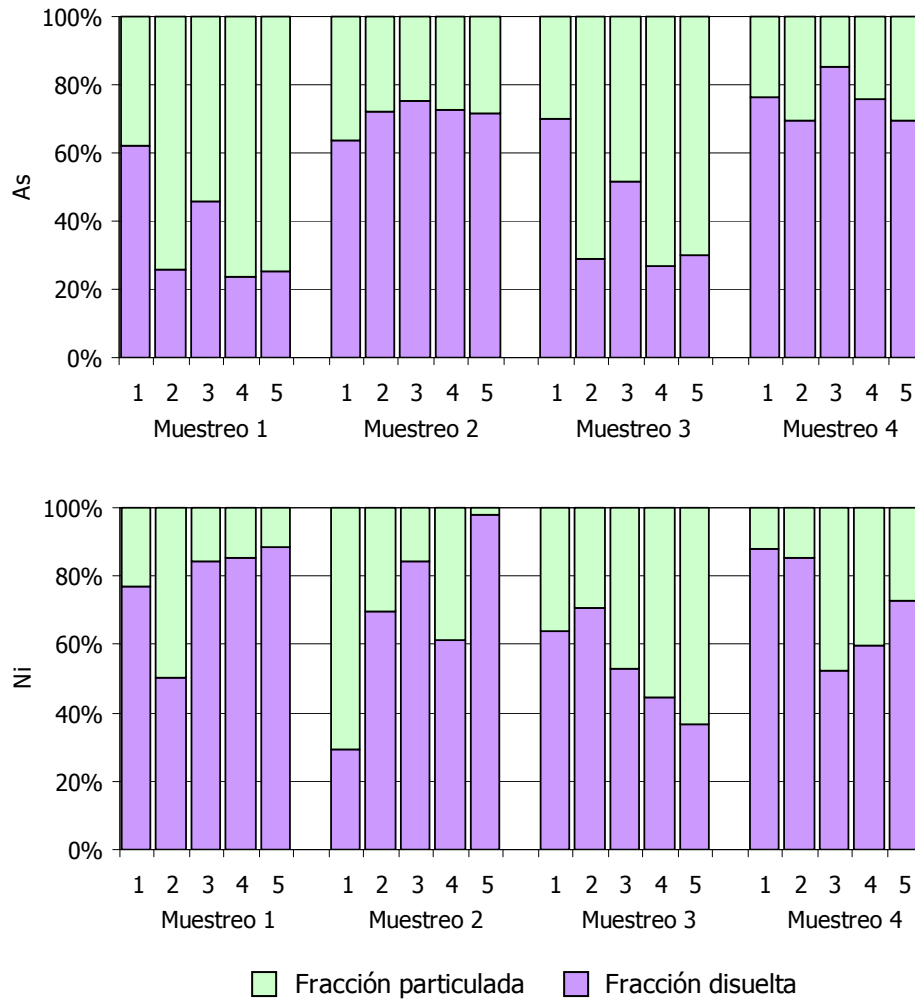


Figura 4.27. Distribución del contenido de As y Ni entre las fracciones disuelta y particulada en agua

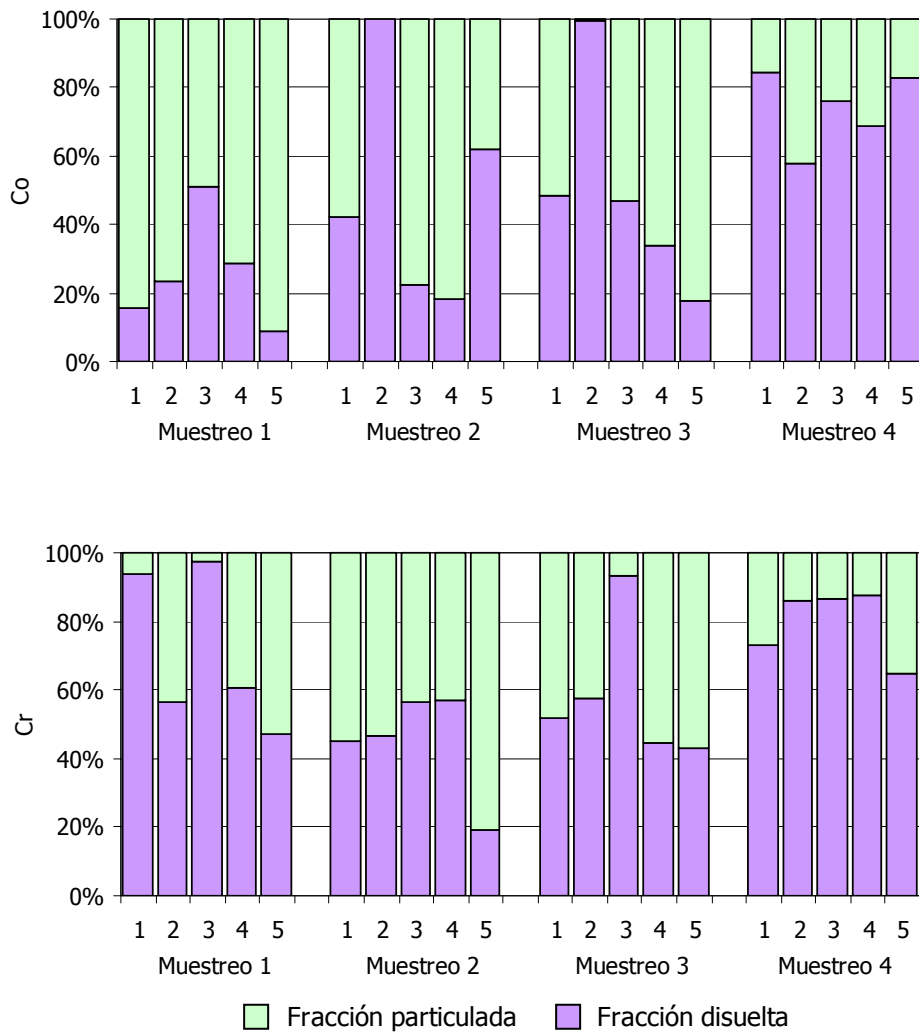


Figura 4.27 (cont.). Distribución del contenido de Co y Cr entre las fracciones disuelta y particulada en agua

En la Figura 4.27 se observa que todos los metales, en condiciones generales, aparecen en diversas ocasiones distribuidos en la fase disuelta más que en la fase particulada, sobre todo para Ni y Cr, hecho que es de esperar dado los bajos niveles de sólidos en suspensión que presentan las aguas. El As muestra elevados porcentajes en la fase disuelta durante los muestreos en primavera (63,8 – 85,5%), mientras que en otoño

los porcentajes fueron menores (23,9 – 69,9%). En cuanto al Ni, aparece mayoritariamente en forma disuelta (52,7 – 97,9%), excepto en la Playa de Getares en el muestreo 2, donde la fase particulada representa un 70% del contenido total y en Guadarranque y Puente Mayorga en el muestreo 3, con valores de 36,5% y 44,4%, respectivamente. Respecto al Co, los datos presentan una mayor variabilidad que en el caso de Ni, puesto que existen muestras con un gran porcentaje de metal particulado y otras con un elevado porcentaje disuelto, próximo al 100%, como en el punto de Isla Verde en el segundo y tercer muestreo. En general, los porcentajes de cobalto en la fase disuelta varían en el rango 9,1 – 100%. En cuanto al fraccionamiento del Cr, cabe destacar que se encontraron niveles de metal disuelto superiores al 50% para la mayoría de las estaciones de muestreo (51,8 – 97,4%), excepto en Puente Mayorga en los muestreos 1, 2 y 3, Playa de Getares e Isla verde en el muestreo 2 y Guadarranque en el muestreo 3, en los que la fracción particulada fue predominante, llegando a alcanzar valores de hasta un 80% en Puente Mayorga durante el muestreo 2.

De esta manera, los metales puede ordenarse de mayor a menor porcentaje en la fracción disuelta, y por tanto, mayor a menor biodisponibilidad, como sigue: Ni > Cr > As > Co, siendo sus porcentajes medios en la fase disuelta: 67,7%, 63,4%, 56,1% y 49,4%, respectivamente.

Asimismo, para poder describir el reparto entre la fase particulada y la disuelta de un metal en un sistema acuático, se define el parámetro K_d , denominado coeficiente de reparto, como la relación existente entre la concentración de dicho metal en la fase particulada (expresada en mg/kg) y su concentración en la fase disuelta (expresada en mg/L). Así, la expresión: $K_d \text{ (L/kg)} = [M_{\text{particulado}}] / [M_{\text{disuelto}}]$, proporciona la razón entre el contenido metálico en la materia en suspensión y la cantidad de metal disuelto en las aguas. El coeficiente de reparto para As se encuentra comprendido en el intervalo 7406 – 139726 L/kg; para Ni, 1347 – 171645; para Co, 0 – 303379; y para Cr, 1038 – 260168 (Tabla 4.21), con medias de 50895; 32954; 93255 y 48560 L/kg, para As, Ni, Co y Cr respectivamente. Los mayores coeficientes de reparto se han obtenido para Co y As, indicando así su afinidad para ser transportados con la fase sólida, y su menor biodisponibilidad en comparación con el Ni y el Cr. Los valores para Ni, Co y Cr son similares a los encontrados en puntos de muestreo de ecosistemas estuáricos y bahías que tenían una salinidad del orden de 30 g/L [Chiffolleau y col., 1994; Comber y col., 1995; Hatje y col., 2003; Tovar-Sánchez y col., 2004; Takata y col. 2010]. Los coeficientes de reparto de As son mayores que los encontrados en la Ría de Huelva, en la Bahía de Cádiz y en el estuario del río Támesis en Reino Unido [Millward y col., 1997a; Vicente Martorell, 2010]. Sin embargo, se parecen a los encontrados en el estuario Humber de Reino Unido [Millward y col., 1997b]. Todos estos datos de K_d se comparan en la Tabla 4.22.

Además, se representó el logaritmo decimal de los valores de K_d para cada uno de los metales frente a los sólidos en suspensión y para cada muestreo con el objetivo de estudiar su evolución. Las gráficas se muestran en las Figuras 4.28, 4.29, 4.30 y 4.31.

Los valores de K_d no evolucionaron significativamente con la concentración de sólidos en suspensión (SS). En las Figuras 4.28-4.31 se observa una ligera subida para As con la materia en suspensión, una tendencia a no incrementarse el valor de K_d con los SS para Co, y una pequeña disminución para Ni y Cr. Para estos dos metales, el incremento de los SS se traduce en un aporte mayor de estos metales en su forma disuelta a la columna de agua, aumentando así su disponibilidad. Por el contrario, aunque en poca medida, el incremento de materia en suspensión favorece la distribución del As en la fase particulada, con un ligero aumento de los valores de K_d . En el caso de Co, la distribución metal particulado/metal disuelto no está afectada por el aumento de los sólidos en suspensión.

Tabla 4.21. Valores de los coeficientes de reparto K_d (L/kg) entre la materia suspendida y la columna de agua para As, Ni, Co y Cr en las aguas de la Bahía de Algeciras

Muestreo	Estación de muestreo	Coeficiente de reparto K_d (L/kg)			
		As	Ni	Co	Cr
1	1	22910	11250	204464	100733
	2	117227	40659	134559	31881
	3	49159	7761	39990	1038
	4	100632	5478	78471	20548
	5	72847	3151	246904	27517
2	1	39946	171645	97354	86137
	2	25944	29316	0	77937
	3	20366	11719	219701	48652
	4	25703	43298	303379	51972
	5	25143	1347	38539	260168
3	1	14939	19336	36958	32070
	2	139726	23663	300	41886
	3	43632	41505	52764	3266
	4	117002	53294	83802	53110
	5	123719	91759	241128	69305
4	1	14908	6412	8928	17418
	2	20112	7743	33198	7440
	3	7406	39875	13763	6854
	4	14681	31396	20811	6466
	5	21900	18479	10087	26798

Tabla 4.22. Comparación de valores de Log K_d (L/kg) de varios ecosistemas acuáticos encontrados en la bibliografía con los encontrados en la Bahía de Algeciras

Ecosistema acuático	As	Ni	Co	Cr	Referencias
Estuario del Támesis (Reino Unido)	3,00				Millward y col., 1997a
Estuario Humber (Reino Unido)	3,30-4,40	3,70		4,20	Millward y col., 1997b; Comber y col., 1995
Estuario Mersey (Reino Unido)		4,30		5,57	Comber y col., 1995
Estuario del Hudson (EEUU)			4,76-4,91		Tovar-Sánchez y col., 2004
Bahía de San Francisco (EEUU)			5,00-5,50		Tovar-Sánchez y col., 2004
Bahía de Sagami (Japón)			4,36-5,90		Takata y col. 2010
Bahía de Wakasa (Japón)			5,48-6,30		Takata y col. 2010
Estuario del Puerto Jackson (Australia)		3,8-4,8			Hatje y col., 2003
Estuario del Sena (Francia)		4,20-4,40	5,00		Chiffolleau y col., 1994
Bahía de Cádiz (España)	0-3,34 ^a				Vicente Martorell, 2010
Ría de Huelva (España)	2,00-3,78				Vicente Martorell, 2010
Bahía de Algeciras (España)	3,87-5,15	3,13-5,24	3,95-5,48	3,02-5,42	Este estudio

^aEl valor de 0 corresponde al valor de K_d y no al Log(K_d)

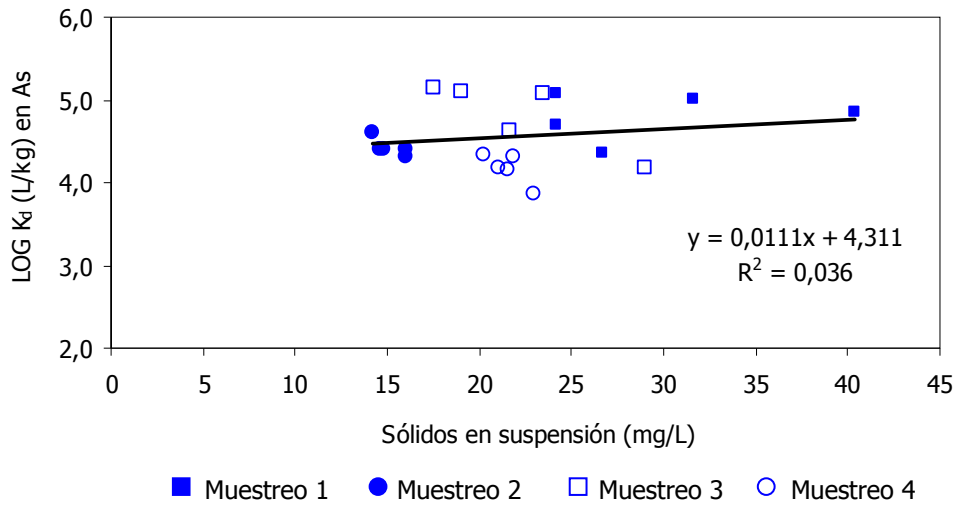


Figura 4.28. Coeficientes de partición de As (expresados como $\text{Log } K_d$ (L/kg)) en función de los sólidos en suspensión durante los 4 muestreos

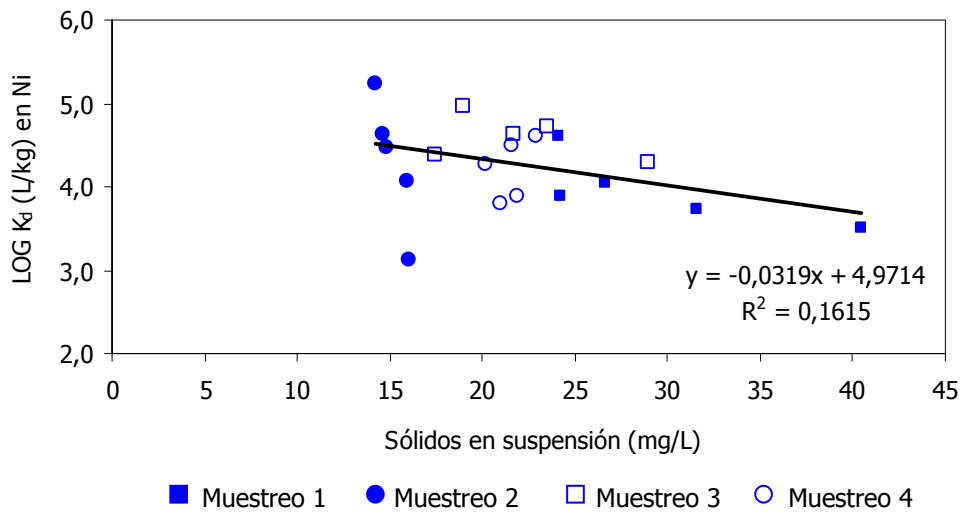


Figura 4.29. Coeficientes de partición de Ni (expresados como $\text{Log } K_d$ (L/kg)) en función de los sólidos en suspensión durante los 4 muestreos

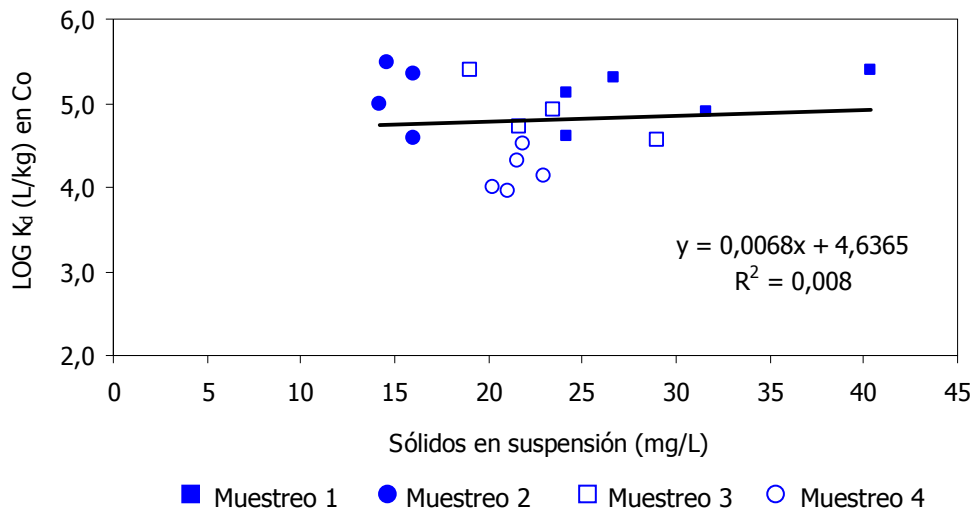


Figura 4.30. Coeficientes de partición de Co (expresados como Log K_d (L/kg)) en función de los sólidos en suspensión durante los 4 muestreos

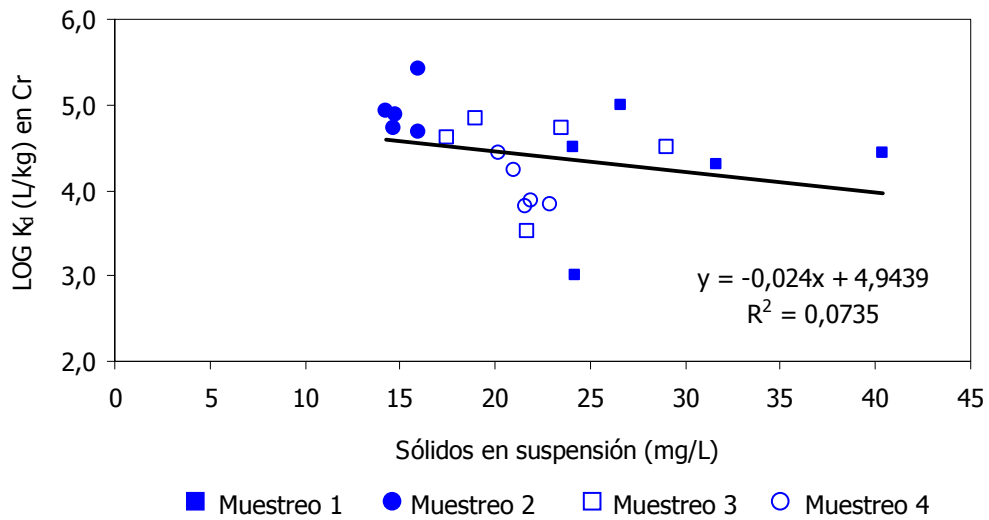


Figura 4.31. Coeficientes de partición de Cr (expresados como Log K_d (L/kg)) en función de los sólidos en suspensión durante los 4 muestreos

Del mismo modo que es importante identificar las tendencias estacionales o espaciales que muestran las concentraciones totales de los metales en las aguas, lo es conocer si existen tendencias estacionales o espaciales en las fases disuelta y particulada en las aguas. Por ese motivo se realizaron los correspondientes estudios del análisis de la varianza sobre el porcentaje de la fracción disuelta o particulada. Al ser complementarias, cualquiera de las dos fracciones es válida para este estudio, habiéndose realizado éste con la fracción disuelta. No se observaron diferencias significativas entre los puntos de muestreo para las fracciones disueltas de los metales estudiados. Sin embargo, según el análisis de las varianzas de Kruskal-Wallis y el test de comparación múltiple, sí se encontraron diferencias significativas para la fracción disuelta de As entre los muestreos 1 y 2, y los muestreos 1 y 4. Además, según el análisis de las varianzas también se encontraron diferencias, aunque no muy significativas, para las fracciones disueltas de Co (en la que p fue ligeramente mayor a 0,05) y Cr (en la que p fue ligeramente menor a 0,05). No obstante, y realizando el test de comparación múltiple se observó más claramente que existían diferencias significativas entre los muestreos 1 y 4 para el Co disuelto, no resultando así para el caso del Cr disuelto. Estas discrepancias entre tests pueden surgir cuando los tamaños de la muestra son algo reducidos, por lo que los resultados para la fracción disuelta de Co y de Cr no son concluyentes.

Por otra parte, se estudió la posible influencia estacional, encontrándose para las fracciones disueltas de As y Co diferencias significativas entre las estaciones, siendo mayor esta fracción, por lo general, en los muestreos de primavera.

Además, se han estudiado las correlaciones que se establecen entre las fracciones disueltas de los metales, observándose que la fracción disuelta de As estaba relacionada de manera positiva con la fracción disuelta de Co, indicando que son metales con un similar comportamiento. Aún así, las correlaciones no fueron muy significativas puesto que los coeficientes de correlación no fueron mayores de 0,7 en valor absoluto.

4.9.1.3. Especiación metálica en aguas

Tal y como se ha indicado anteriormente, se realizó la especiación de los metales As, Ni, Co y Cr en las aguas de la Bahía de Algeciras. Los resultados se detallan en las Tablas A.5, A.6, A.7 y A.8 del Anexo 4.1.

Especiación de Arsénico

La especiación de As en agua se realizó a partir del esquema que se ha descrito previamente en la Figura 4.6, el cual separa las especies de As en las siguientes fracciones: particulada orgánica e inorgánica así como disuelta orgánica e inorgánica. En ambos casos, las formas inorgánicas tienen mayor toxicidad que las orgánicas, y las formas particuladas

son menos disponibles que las formas disueltas. Por tanto, en función de estos niveles se puede determinar el grado de toxicidad y/o disponibilidad de este metal. En las Figuras 4.32 y 4.33 se han representado estos resultados, expresados tanto en $\mu\text{g/L}$ como en tanto por ciento del total correspondiente.

Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, el As disuelto se encuentra en mayor proporción que el As particulado, con lo que se ve favorecida la disponibilidad de este metal. A esto hay que añadir que, con algunas excepciones, la mayoría de las muestras de agua presentaron un mayor porcentaje de As disuelto inorgánico, sobre todo en la estación de muestreo de Puente Mayorga en todos los muestreos, Palmones en el muestreo 3, Isla Verde en el muestreo 2, Getares en el muestreo 1 y Guadarranque en el segundo y cuarto muestreo, donde aproximadamente el 100% de este metal estaba en forma inorgánica. Además, parece que el As disuelto total presentó una tendencia estacional, con mayores concentraciones en los muestreos de primavera que en los de otoño. Este comportamiento estacional es opuesto en el As particulado. En este caso, el As particulado inorgánico es mayoritario en el punto de Palmones, durante los 4 muestreos, en Guadarranque en los muestreos de otoño y en Getares en el muestreo 2.

Especiación de Ni y Co

La especiación de Ni y Co se realizó a partir del esquema representado en la Figura 4.7, según el cual se establece la distribución de las especies metálicas en cinco fracciones diferentes: metal total, metal disuelto, metal particulado, metal disuelto lábil y metal disuelto poco/no lábil.

Las formas químicas disueltas están más disponibles que las particuladas, y dentro de las disueltas, las especies que son libres o que presentan asociaciones lábiles son las que representan la mayor biodisponibilidad metálica de un ecosistema acuático.

En el apartado anterior se ha evaluado la distribución metálica correspondiente con las fracciones particulada y disuelta. En este apartado, se describirá la distribución metálica en la fase disuelta, distinguiendo entre la fracción lábil y la poco o no lábil.

En la Figura 4.34 se han representado los resultados de la especiación de la fase disuelta, expresados tanto en $\mu\text{g/L}$ como en tanto por ciento del total correspondiente.

En este estudio, se observó que la cantidad de Ni lábil varió en función del muestreo, siendo su distribución mayor en los muestreos de primavera. De hecho, en la Playa de Getares (muestreo 1 y 3), Isla Verde (muestreo 4), Palmones (muestreo 2 y 4) y Guadarranque (muestreos 1 y 2) la forma de Ni predominante es como Ni poco o no lábil. Pero para todos los restantes puntos, fue el Ni lábil la fase predominante, que es la más disponible.

Respecto a la especiación de Co, los datos se muestran en la Figura 4.35. Para este metal se observó un valor puntual más elevado de metal disuelto en el punto de Guadarranque en los muestreos de primavera, aunque el metal poco lábil es mayor que el lábil.

Para los restantes puntos, y en general, el Co se encuentra en su fase poco o no lábil, excepto en Palmones, en el muestreo 3, y Getares, Guadarranque y Puente Mayorga, en el muestreo 4, siendo en estas ocasiones más disponibles. Para concluir, se puede decir que de los metales cuya especiación fue estudiada, éste fue el que presentó menores niveles de concentración y a su vez menor disponibilidad, y esta disponibilidad no fue mayor en las estaciones de primavera como ocurrió para As o Ni, aunque se verá posteriormente que los niveles guía para este metal son menores que para el resto, por lo que aunque tenga menores concentraciones, estos valores superan los niveles usuales descritos en la bibliografía de forma destacada.

Especiación de Cr

En relación a la especiación de Cr en agua hay que indicar que además de obtener las fracciones de metal disuelto y particulado, se evaluaron las fracciones de Cr disuelto activo, (dentro de la cual se diferenció entre Cr(VI) disuelto y Cr(III) disuelto activo) y Cr(III) disuelto no activo (Figura 4.8). El estado de oxidación VI es el que presenta una mayor toxicidad y el cromo disuelto activo es el más disponible. En la Figura 4.36 se representan los niveles de Cr(VI) disuelto y Cr(III) disuelto, sin diferenciar entre activo y no activo, expresados tanto en $\mu\text{g/L}$ como en tanto por ciento del contenido disuelto. En la Figura 4.37, se representan los niveles de Cr(III) disuelto activo y Cr(III) disuelto no activo, también expresados en $\mu\text{g/L}$ y en tanto por ciento del contenido de Cr(III) disuelto.

De la Figura 4.36 se obtiene que gran parte de las muestras de agua tienen el cromo disuelto en su estado de oxidación III, excepto durante el tercer muestreo donde los porcentajes de Cr(VI) superan ligeramente los de Cr(III). Además, cabe destacar que en aquellos puntos donde se incrementa la concentración de Cr disuelto, lo hace incrementando el Cr(III).

Como puede verse en la Figura 4.37 el Cr(III) disuelto activo presenta mayores concentraciones que el no activo la mayoría de las muestras, implicando así que predominan los complejos inorgánicos de Cr(III), por lo que son bastante disponibles para la biota acuática en la mayoría de los puntos de muestreo. Sin embargo, cuando se incrementa la concentración de Cr(III) sube el porcentaje de cromo inactivo.

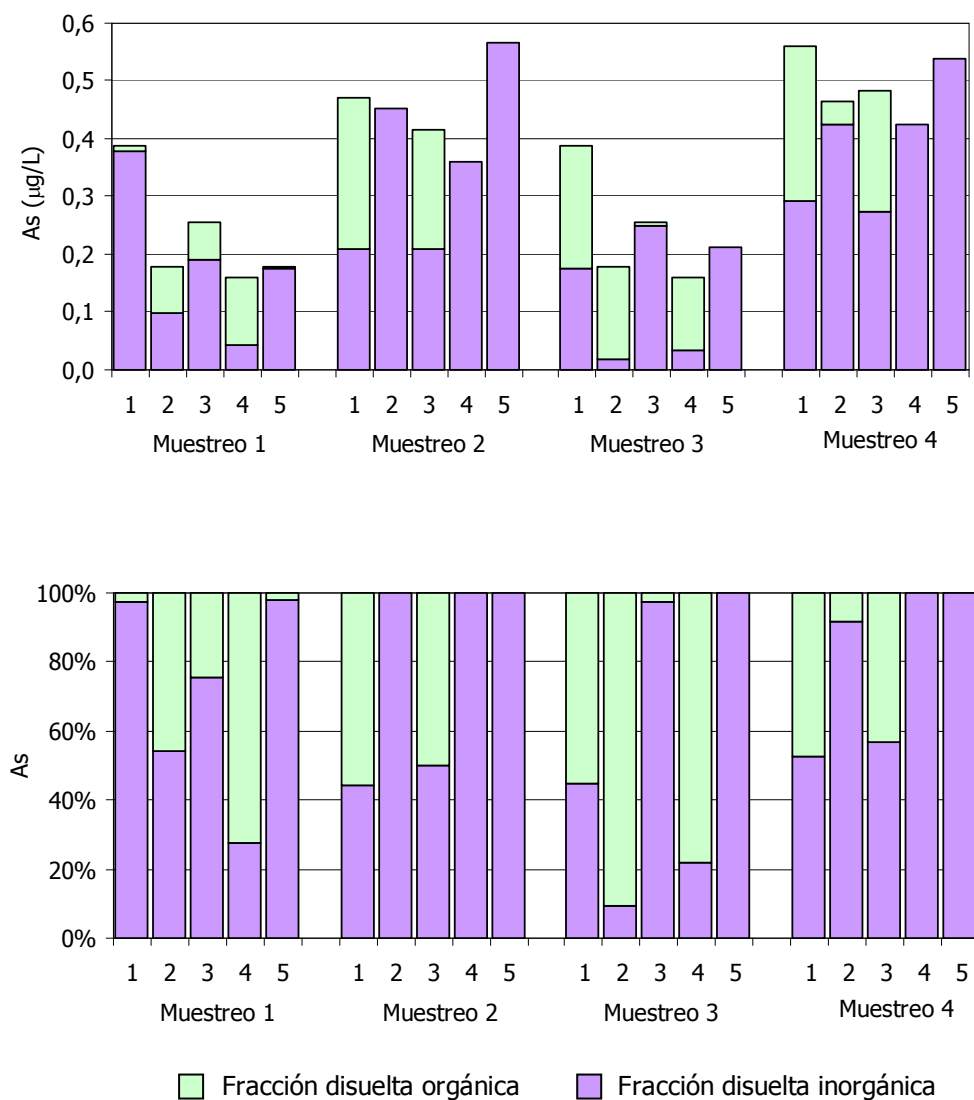


Figura 4.32. Especiación de As disuelto en aguas y porcentaje de distribución entre las fracciones disueltas orgánica e inorgánica

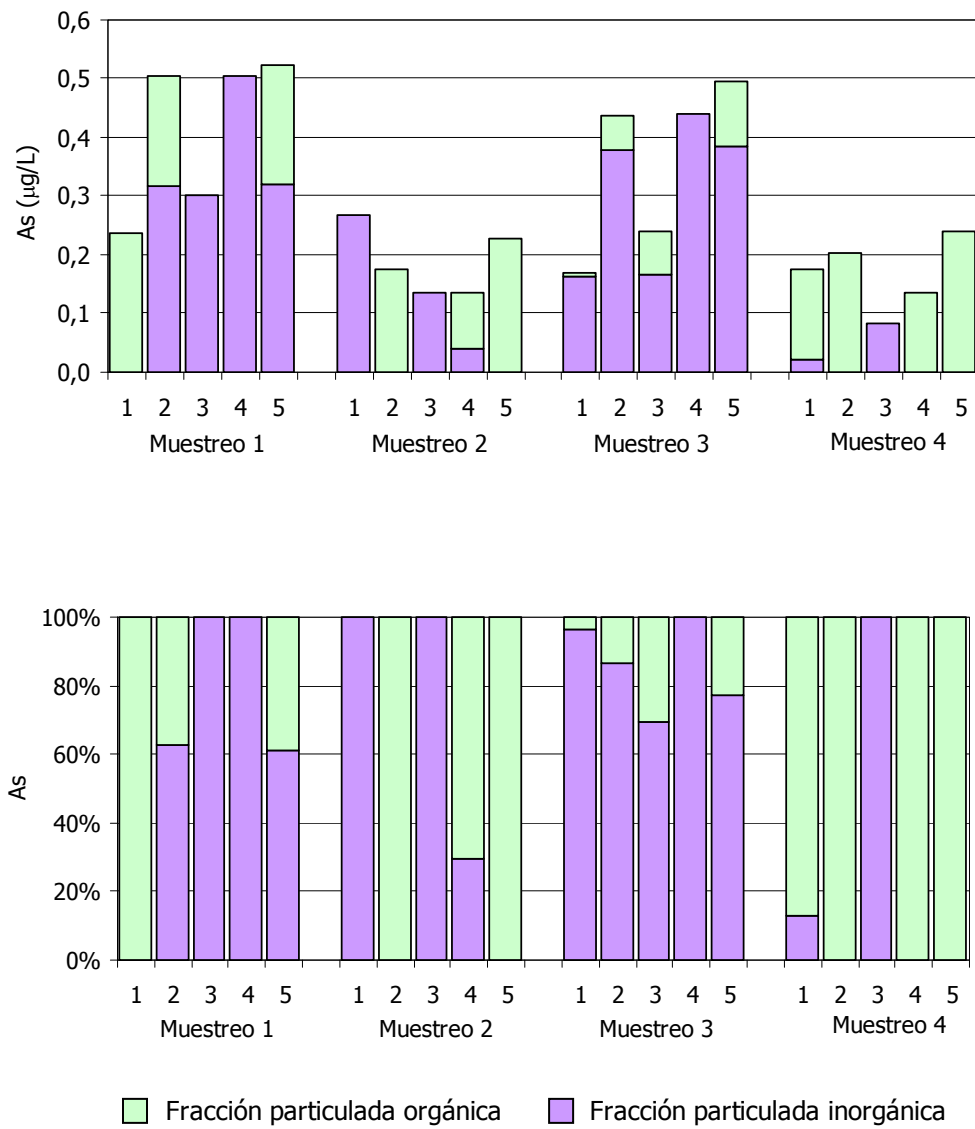


Figura 4.33. Especiación de As particulado en aguas y porcentaje de distribución entre las fracciones particuladas orgánica e inorgánica

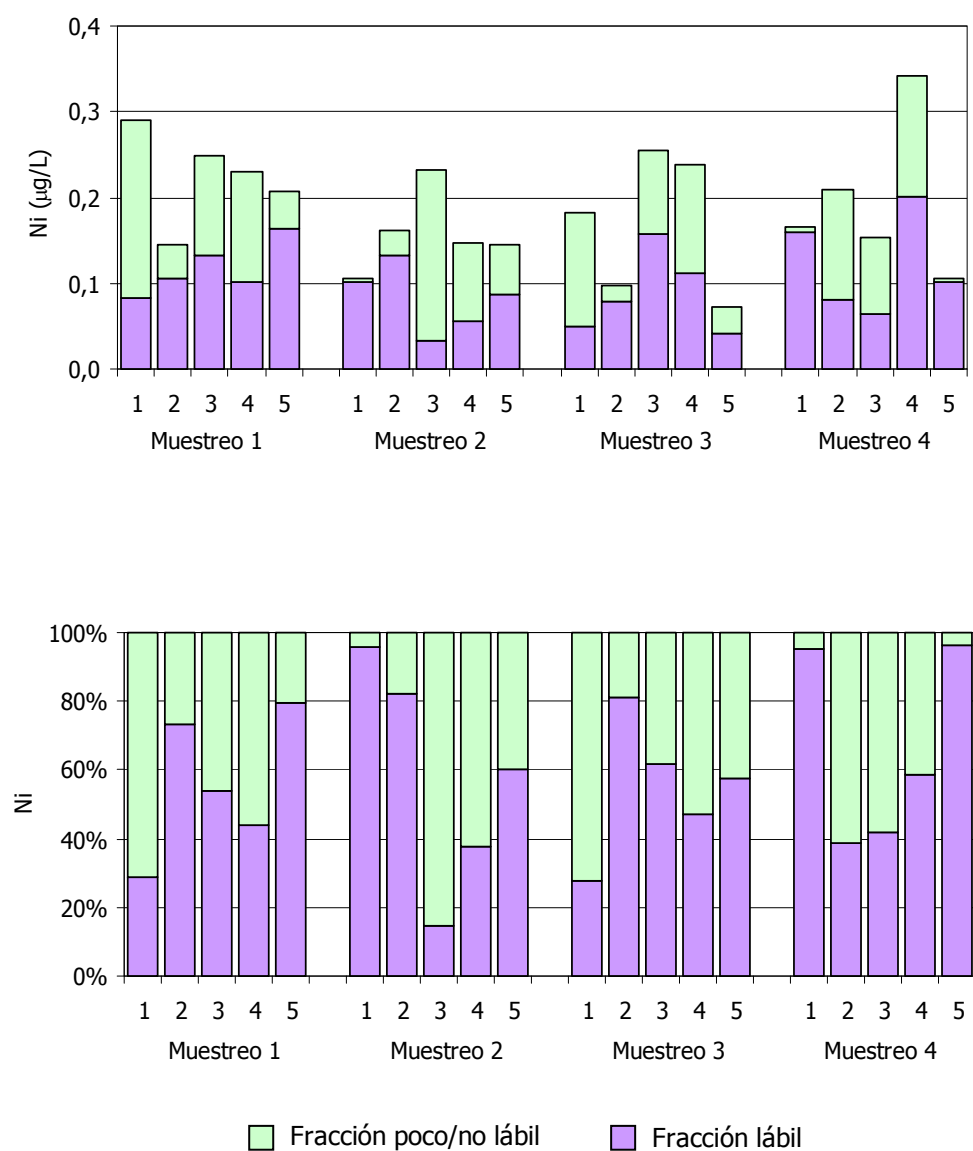


Figura 4.34. Especiación de Ni disuelto en aguas y porcentaje de distribución entre las fracciones disueltas poco/no lábil y lábil

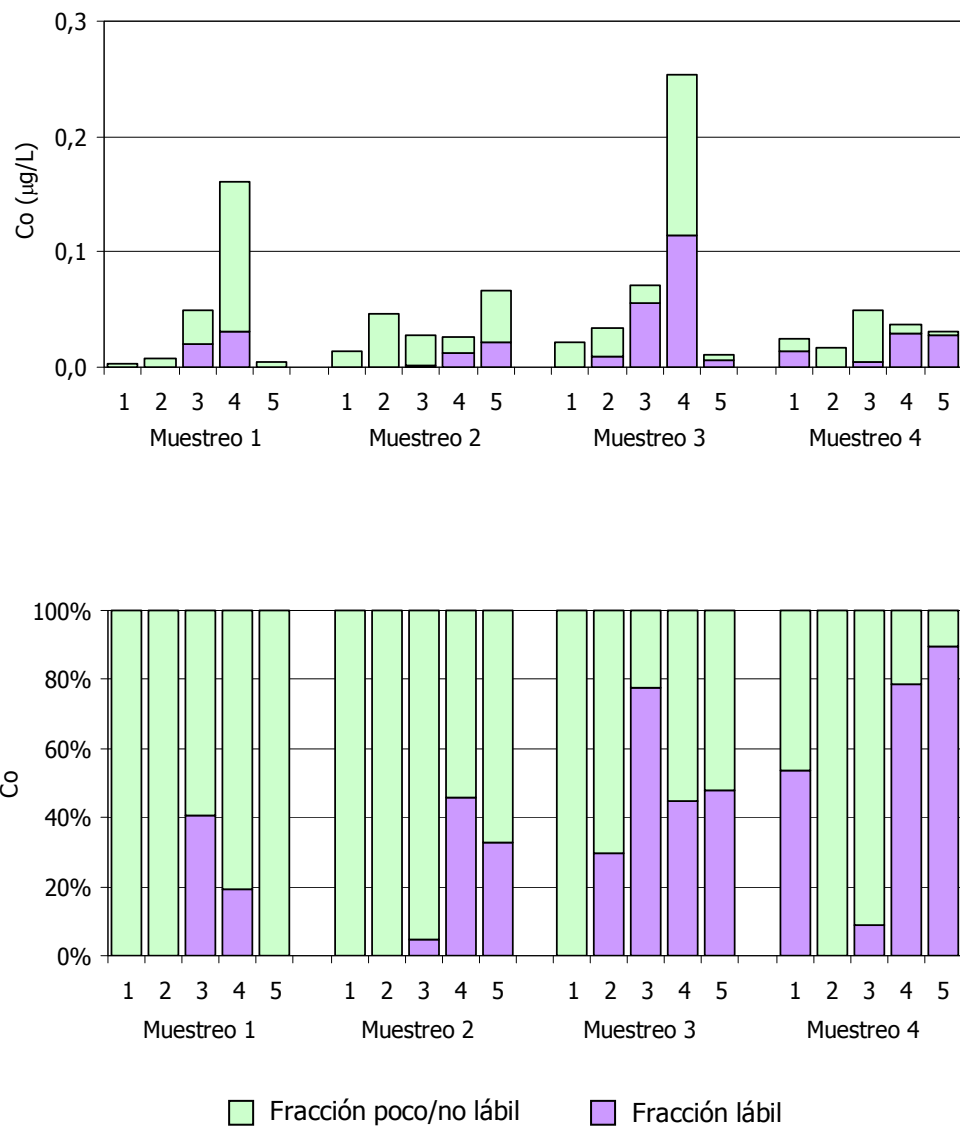


Figura 4.35. Especiación de Co disuelto en aguas y porcentaje de distribución entre las fracciones disueltas poco/no lábil y lábil

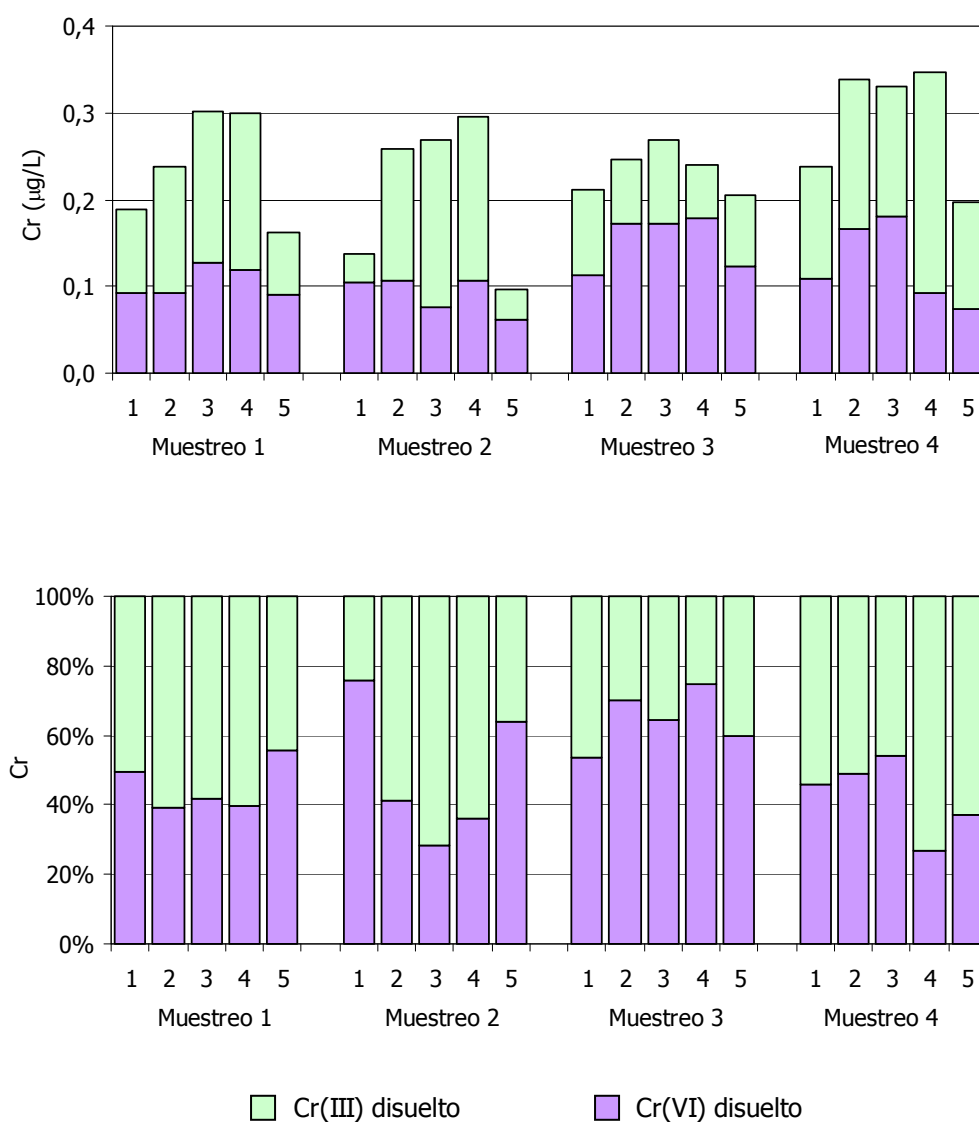


Figura 4.36. Especiación de Cr disuelto en aguas y su porcentaje de distribución entre Cr(III) y Cr(VI) disuelto

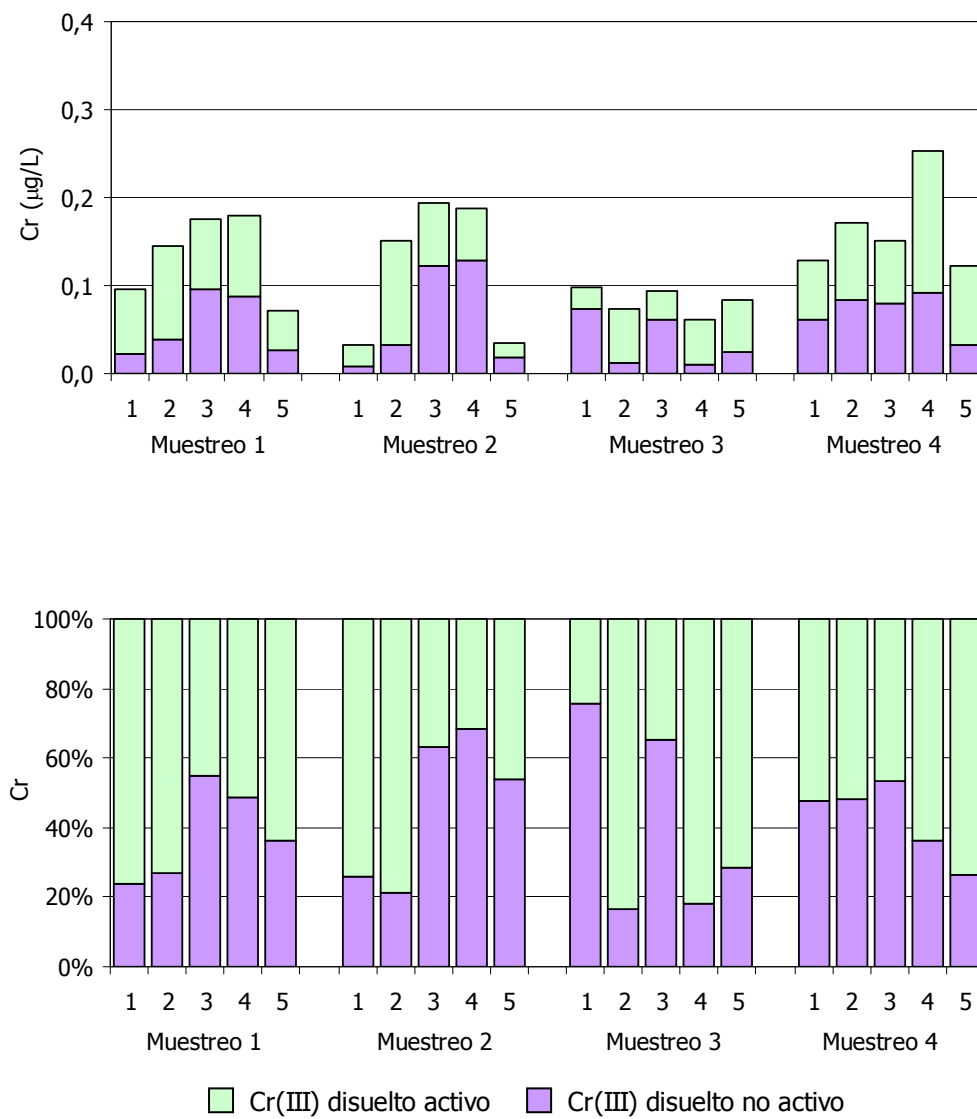


Figura 4.37. Especiación de Cr disuelto en aguas y su porcentaje de distribución entre Cr(III) disuelto activo y Cr(III) disuelto no activo

Con objeto de estudiar estadísticamente la posible influencia espacial y estacional, en los resultados obtenidos en el estudio de la especiación de metal disuelto, se han aplicado los correspondientes análisis de comparación de las varianzas. Estos análisis desvelaron que no existe diferencia significativa para ninguna fracción de los metales estudiados entre muestreos, puntos de muestreo o estaciones.

Por otra parte, se estudió la posible relación existente entre todas las fases de la especiación, incluyendo las fracciones disuelta y particulada. Se observó que existía correlación positiva significativa entre la fracción de As disuelto con la de Cr(III) disuelto no activo, y entre la fracción de Ni disuelto lábil con la fracción disuelta de Co, aunque el coeficiente de correlación fue, en ambos casos, menor de 0,7. Por último, se observaron correlaciones negativas entre la fracción de As particulado inorgánico con la fracción de Cr(III) disuelto activo, entre la fracción de Ni disuelto lábil con la de Cr(III) disuelto no activo, entre la fracción de Cr(VI) disuelto con la de Cr(III) disuelto activo, y entre la fracción de Cr(VI) disuelto con la de Cr(III) disuelto no activo, aunque igualmente los coeficientes de correlación fueron menores de 0,7 en valor absoluto.

4.9.2. Contenido metálico en sedimentos

Los sedimentos son una parte esencial de los ecosistemas acuáticos y juegan un papel importante en la distribución de los contaminantes en el medio. El estudio de la calidad de los sedimentos proporciona información sobre la *salud* del ecosistema. Así, actividades antropogénicas en áreas costeras, como la Bahía de Algeciras, implican frecuentemente una entrada de contaminantes al medio, provocando la disminución de la calidad de los sedimentos. Los sedimentos actúan como sumidero de contaminantes, de forma que pueden llegar a afectar a las comunidades biológicas [Tolun y col., 2001].

Los sedimentos acumulan mayores cantidades de metales pesados que el agua, causando serios problemas debido a su toxicidad y bioacumulación [Morillo y col., 2007; Larner y col., 2008] y reflejando mejor la calidad del ecosistema. El comportamiento de los metales en los sedimentos, al igual que en las aguas, depende de su forma química, que a su vez afecta a su movilidad, biodisponibilidad y toxicidad. Por tanto la determinación del contenido total metálico no es un indicador particularmente útil de la calidad de los sedimentos. Por ejemplo, algunos metales se encuentran en formas químicas que no pueden ser asimilados por la biota, y por tanto no conllevan ningún riesgo para los organismos acuáticos. Así, la cuantificación de las diferentes especies químicas en las que se encuentran los metales proporciona un mejor indicador de calidad del medio.

4.9.2.1. Concentración total en sedimentos

Los niveles de concentración totales de los metales en sedimentos en la Bahía de Algeciras se muestran en la Figura 4.38. Los valores de las concentraciones, se encuentran dentro de los intervalos siguientes: As: 5,0 – 24,3 mg/kg; Ni: 27,2 – 198,1 mg/kg; Co: 7,1 – 30,1 mg/kg y Cr: 44,7 – 394,7 mg/kg. El contenido medio es: As: 10,6 mg/kg; Ni: 83,7 mg/kg; Co: 13,8 mg/kg y Cr: 175,4 mg/kg. A partir de estos datos, se pueden ordenar los metales de mayor a menor contenido medio en la bahía: $[Cr] > [Ni] > [Co] > [As]$.

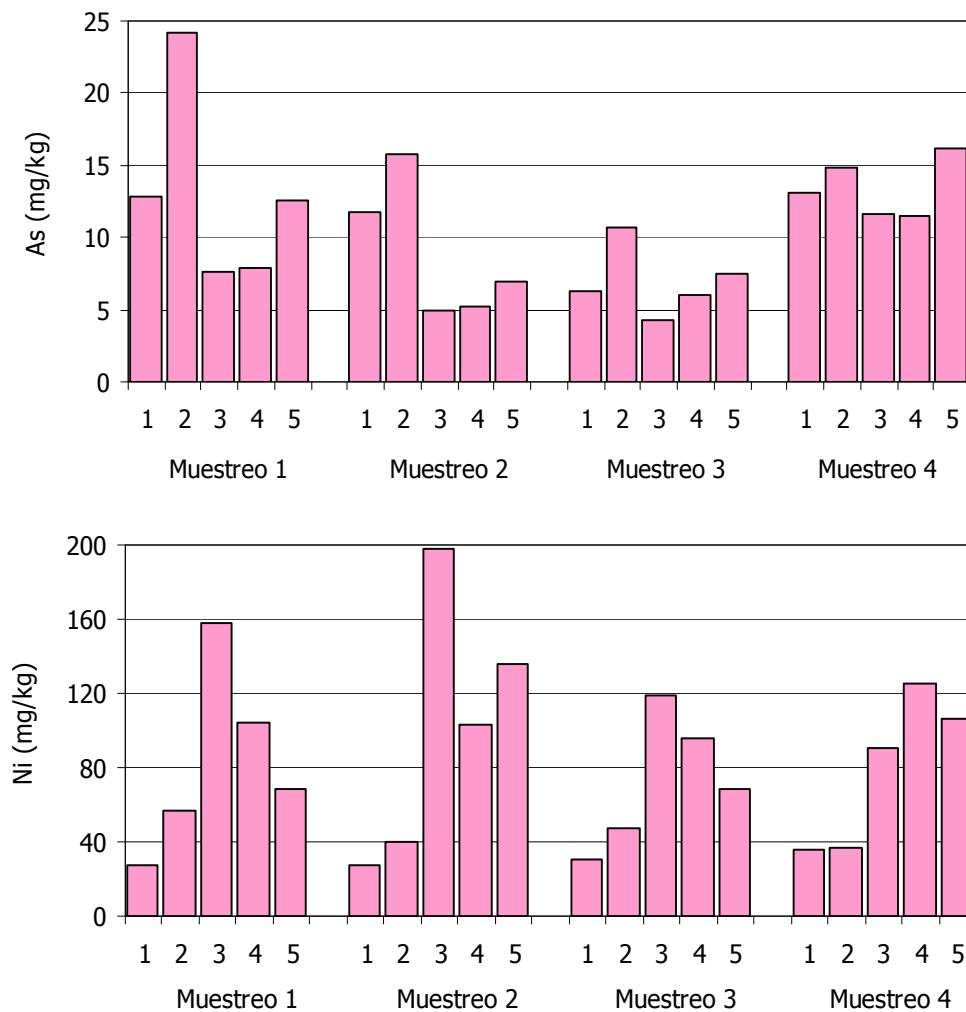


Figura 4.38. Concentración total de As y Ni en sedimentos en las estaciones de la Bahía de Algeciras para cada campaña de muestreo

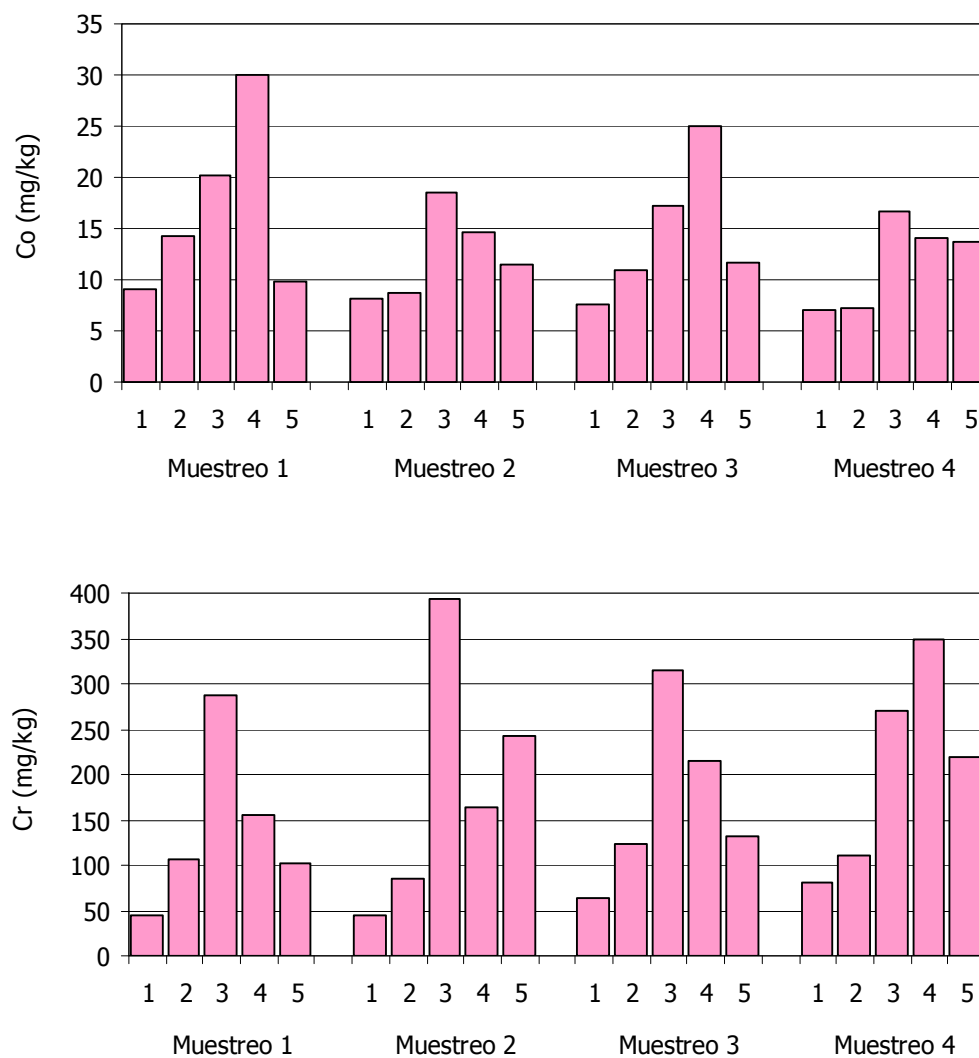


Figura 4.38 (cont.). Concentración total de Co y Cr en sedimentos en las estaciones de la Bahía de Algeciras para cada campaña de muestreo

Con respecto a la Figura 4.38 se puede observar que, en la Bahía de Algeciras, destacan en general que los valores de concentración para Ni y Cr han sido superiores en la estación situada en Palmones, donde está ubicada la empresa Acerinox, ya que son metales ampliamente utilizados en industrias de aceros inoxidables.

En el caso del As, la estación que presentó mayor nivel de concentración en sedimentos fue Isla Verde. Comparando estos datos con los encontrados para las aguas, se vio cómo en este punto se obtuvieron valores considerables de K_d , pudiendo verse favorecida la transferencia del metal de la columna de agua al sedimento, debido a su afinidad para ser transportados con la fase sólida.

Para los restantes metales, esta relación entre K_d y los niveles en sedimentos no fue tan evidente. Así, para Cr los mayores valores de K_d se detectaron fundamentalmente en Puente Mayorga, mientras que la acumulación en los sedimentos destacó en Palmones o Guadarranque, probablemente por su cercanía a la empresa Acerinox y a la refinería, y como consecuencia de aportes que rápidamente llegan al sedimento y no dependen de procesos de intercambio con la columna de agua.

Respecto a la variación de los niveles en los diversos puntos muestreados, se puede observar que en los 4 metales se mantiene la misma tendencia entre puntos del contenido metálico total en los cuatro muestreos. Es decir, la comparación entre los puntos deja el mismo resultado entre muestreos, variando levemente el valor de concentración, con pocas excepciones, como la concentración de Ni en Puente Mayorga en el muestreo 2 y 4 que no desciende en comparación a los niveles de Guadarranque como ocurre en los muestreos 1 y 3. También existe alguna pequeña variación en el punto con mayor concentración de Co, oscilando entre Palmones y Guadarranque, según el muestreo, ocurriendo también para Cr.

De la misma manera que para las aguas, también se estudiaron las posibles influencias espaciales y estacionales que podían presentar los metales en los sedimentos. Así, aplicando los tests estadísticos correspondientes se observó que no existían diferencias significativas entre muestreos ni estaciones para ningún metal. Sin embargo, sí se encontraron diferencias significativas entre los puntos 1 y 3 para el Ni ($p=0,008$), Co ($p=0,019$) y Cr ($p=0,003$), y entre los puntos 1 y 4 para el Co ($p=0,023$). De hecho, el punto 1 de Getares para estos metales es el que menos concentración presenta, mientras que los puntos 3 (Palmones) y 4 (Guadarranque) son los que tienen mayor concentración.

Las correlaciones de Pearson más significativas se encontraron entre los metales Ni y Cr, y Ni y Co, de forma positiva y con coeficientes de correlación muy elevados de 0,918 ($p=0,000$) y 0,713 ($p=0,000$). Igualmente, se estudió si existía relación entre el contenido metálico total en sedimentos y los parámetros físico-químicos, encontrándose que ninguno de los metales estaba relacionado con estos parámetros. Esto indicó que su

comportamiento en la bahía no se veía influenciado por procesos de este tipo, siendo más bien la influencia antropogénica la que definía el comportamiento metálico.

Comparando los valores observados en los sedimentos de la Bahía de Algeciras con los encontrados en otros ecosistemas acuáticos, se puede decir que:

- Los valores de concentración de As encontrados en los sedimentos de la Bahía de Algeciras son similares a las concentraciones observadas en la Bahía de Cádiz, donde los valores variaban en el rango 6,77-14,48 mg/kg. Sin embargo, están muy por debajo de los niveles encontrados en la Ría de Huelva, en donde el As se halla en el intervalo 85,1-615,4 mg/kg [Vicente Martorell, 2010].

- Los valores de Ni y Cr están por encima de los encontrados en otros ecosistemas, como en la Bahía de Bohai en China, en la que los intervalos variaban entre 23,4 y 52,7 mg/kg para el Ni y 60,1-224,5 mg/kg para el Cr [Gao y Chen, 2012], o la Bahía de Cádiz, en donde los intervalos fueron 2,2-39,3 mg/kg para el Ni, y 8,14-42 mg/kg para el Cr [Morillo y col., 2007]. Estos últimos autores también estudiaron las concentraciones de Ni y Cr en sedimentos de Algeciras, obteniendo valores de 16-100 mg/kg para Ni y 20-148 mg/kg para el Cr [Morillo y col., 2007], algo menores que los encontrados en este estudio. Además, los valores de Ni en sedimentos de la costa de Galicia fueron de 1,04-16,2 mg/kg [Morales-Caselles y col., 2007], también muy por debajo a los encontrados en la Bahía de Algeciras en este estudio.

- Los valores de Co también están por encima de los observados en la costa de Galicia (que estuvo afectada por un vertido puntual de petróleo en 2002 debido al accidente del buque Prestige), en donde los valores de Co en sedimentos se encontraban en la mayoría de los puntos de muestreo por debajo del límite de detección y con un máximo de 2 mg/kg [Morales-Caselles y col., 2007].

4.9.2.2. Especiación metálica en sedimentos

Los procesos de extracción secuencial han sido desarrollados para evaluar las fracciones metálicas presentes en los sedimentos. Aunque requieren bastante tiempo, proporcionan información detallada sobre el origen, disponibilidad físico-química y biológica, movilización y transporte de los metales traza. Como se ha indicado anteriormente, el esquema de extracción secuencial metálica de sedimentos, propuesto por el Programa de Medición y Ensayo de la Comisión Europea (BCR), y aplicado en el presente estudio para los metales As, Ni, Co y Cr, separa las especies metálicas en tres fases: la fase intercambiable (metales solubles en agua y ácidos débiles, y asociados a carbonatos), la fase reducible (metales asociados a óxidos de hierro y manganeso) y la fase oxidable (metales asociados a la materia orgánica y sulfhídrica), dejando un residuo sólido con el

contenido inerte del sedimento. Las especies metálicas presentes en la primera fase son las que constituyen la fracción más lábil y disponible en el sedimento, les sigue los metales asociados a óxidos de hierro y manganeso, y los asociados a la materia orgánica y sulfhídrica. Por último, las especies que aparecen en el residuo sólido son las menos disponibles.

Los datos del estudio de la especiación se detallan en la Tabla A.9 del Anexo 4.2 y se muestran en la Figura 4.39, donde se representan las concentraciones y los porcentajes de cada fase que se encontraron con respecto al contenido total.

A partir de estos datos se pueden hacer una serie de observaciones que se recogen a continuación:

En la Figura 4.39 se aprecia que el As se encontraba en la Bahía de Algeciras de forma mayoritaria en el residuo sólido, siendo su contenido de As del 75-80% del total en casi todos los casos, excepto Guadarranque en otoño de 2007 y Palmones, Guadarranque y Puente Mayorga en la primavera de 2008, donde predominó la fase reducible, e incluso metal intercambiable, aunque su concentración era muy baja.

En cuanto al Ni, la fase mayoritaria fue el residuo sólido que alcanzó entre el 80 y 90% del contenido total. En relación a las otras fases de la especiación, hay bastantes sedimentos con Ni en la fase oxidable, por lo que no existe ninguna tendencia a pasar a la columna de agua siendo poco disponible para la biota acuática, aunque en las estaciones de Palmones, Guadarranque y Puente Mayorga existe cierto porcentaje de metal intercambiable.

El Co se distribuyó también en el residuo sólido, pero en menor porcentaje, siendo su contenido del 60-70%, teniendo además un porcentaje de aproximadamente el 10% en la mayoría de los puntos de Co en la fase oxidable. Además, en los puntos de Palmones y Guadarranque, se detectó metal en la fase intercambiable de forma destacada, por lo que en estas estaciones potencialmente puede tender el metal a pasar a la columna de agua, siendo por tanto más disponible para la biota acuática. Por último, cabe destacar que en la estación de Guadarranque el Co predominó en los extractos de las fases 1, 2 y 3, destacando, por ello, del resto.

Respecto al Cr, se encontró en la Bahía de Algeciras de forma mayoritaria en el residuo sólido, siendo su contenido del 90% del total en casi todos los casos. Dentro de las fases de la extracción secuencial, el Cr aparecía principalmente asociado a la materia orgánica y sulfhídrica.

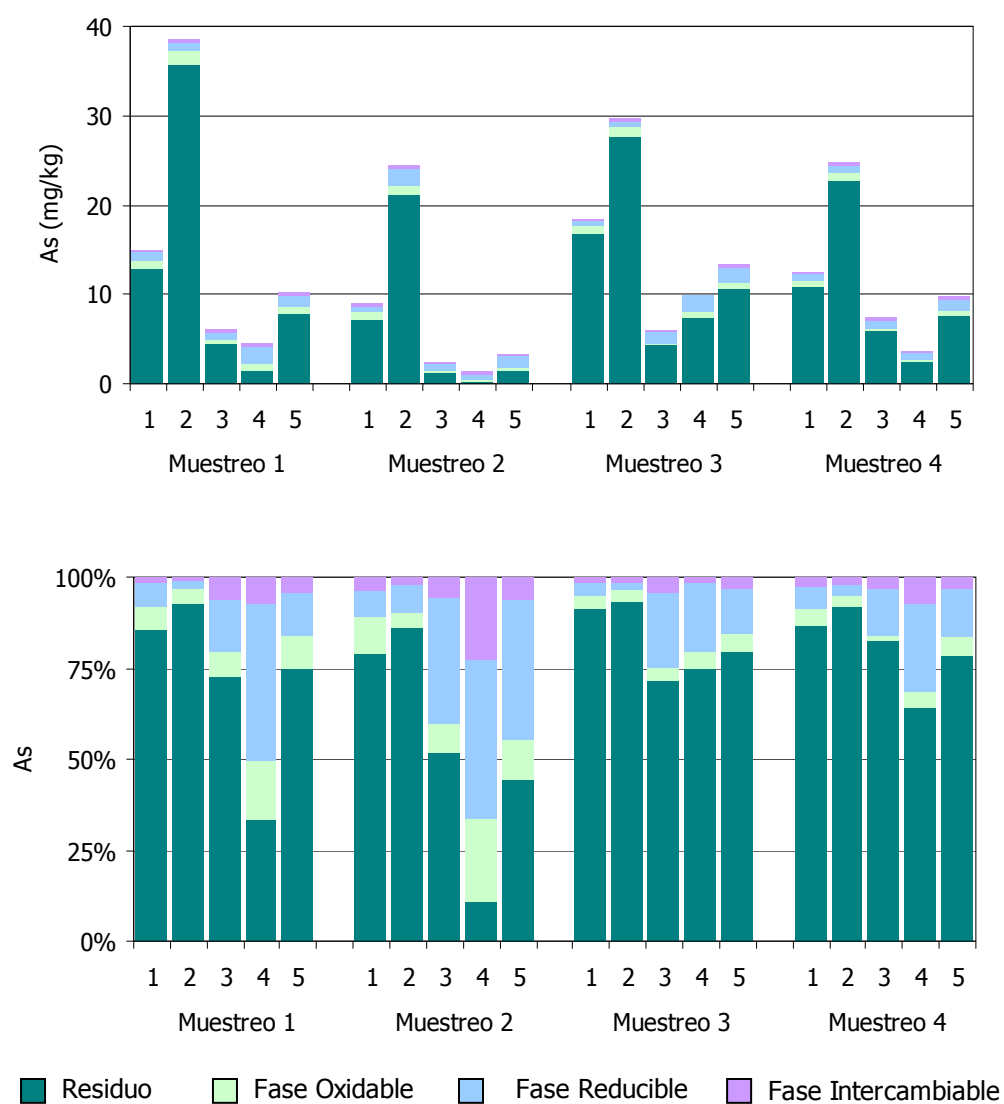


Figura 4.39. Concentración y porcentaje de distribución de As en cada fase del esquema de extracción en sedimentos de la Bahía de Algeciras

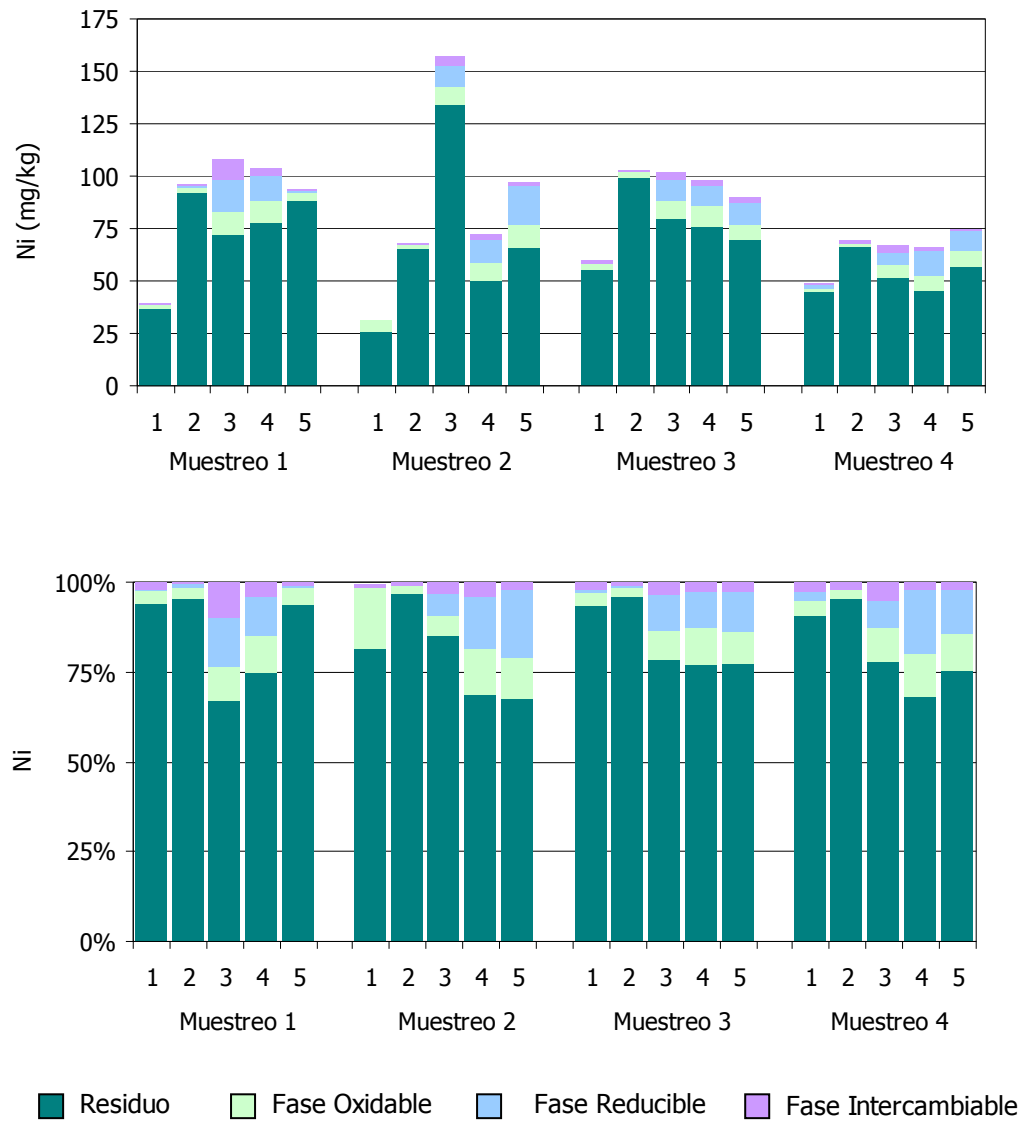


Figura 4.39 (cont.). Concentración y porcentaje de distribución de Ni en cada fase del esquema de extracción en sedimentos de la Bahía de Algeciras

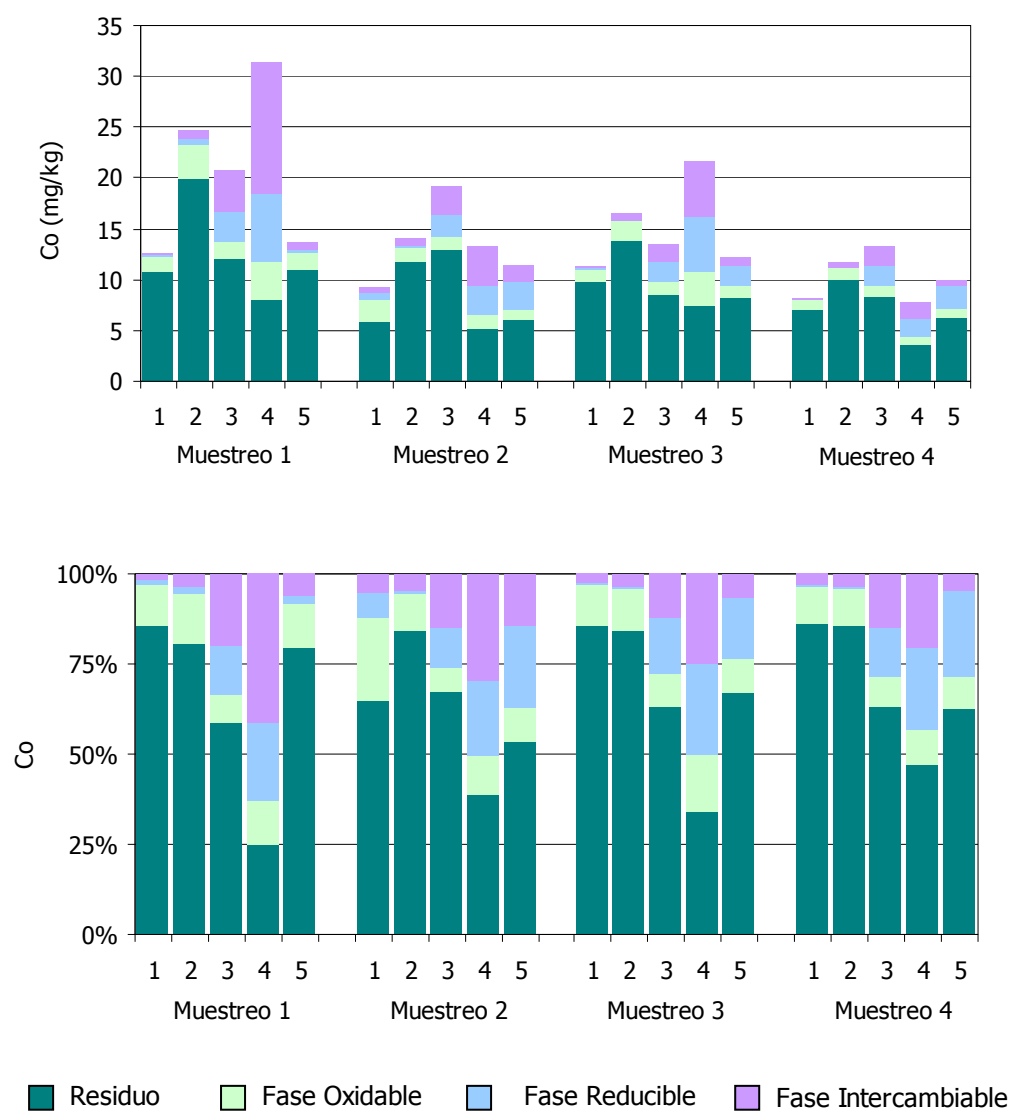


Figura 4.39 (cont.). Concentración y porcentaje de distribución de Co en cada fase del esquema de extracción en sedimentos de la Bahía de Algeciras

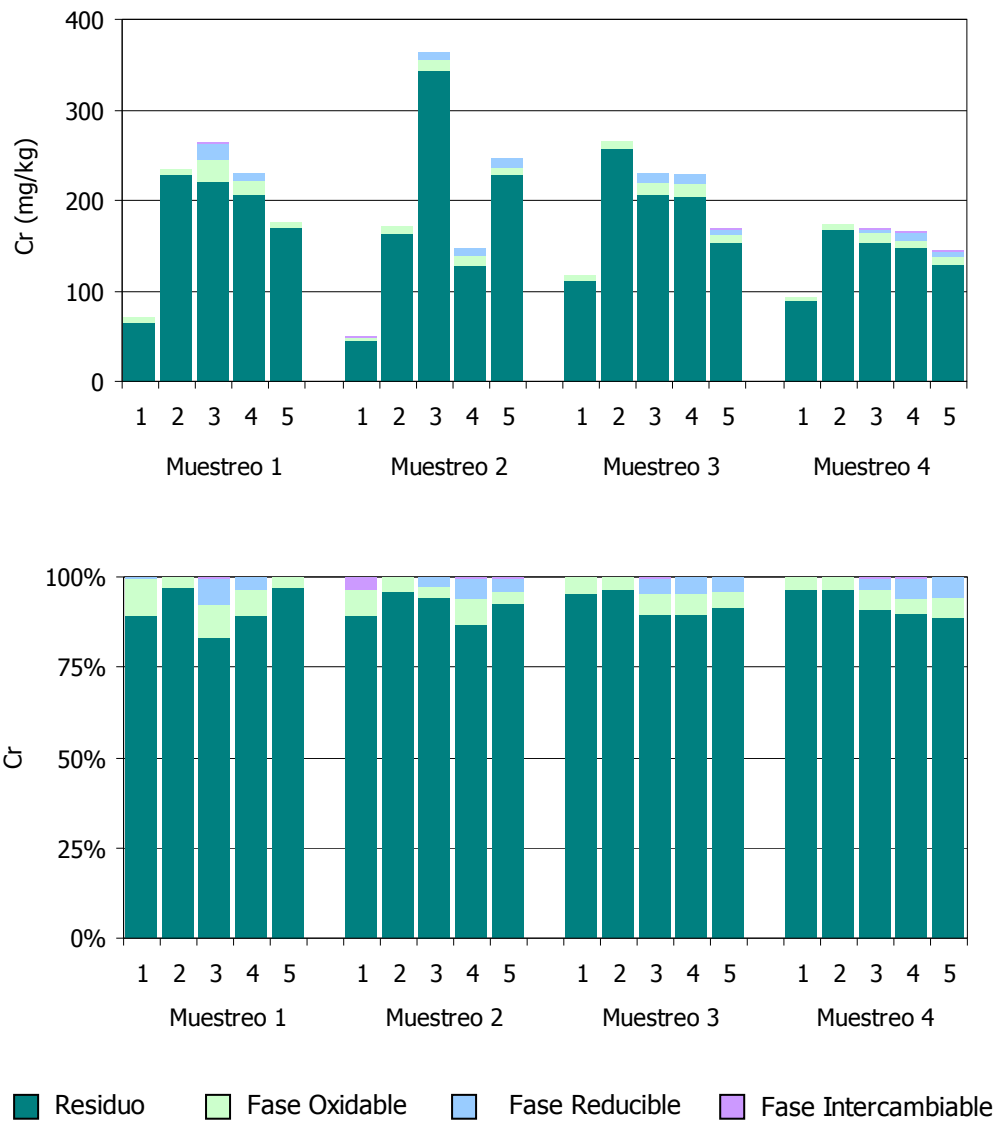


Figura 4.39 (cont.). Concentración y porcentaje de distribución de Cr en cada fase del esquema de extracción en sedimentos de la Bahía de Algeciras

En general se puede decir que en la Bahía de Algeciras el Ni y el Cr son metales muy poco biodisponibles en los sedimentos, estando asociados principalmente a la fase residual, lo cual significa que se encuentran fuertemente incluidos en la estructura cristalina de los sedimentos y es muy difícil que se remobilicen a menos que se den condiciones muy extremas. Otros autores también encontraron este tipo de comportamiento para el Ni y el Cr en otros ecosistemas acuáticos [Sahuquillo y col., 2003; Morillo y col., 2007].

Si se comparan estos resultados con los obtenidos para la especiación de estos dos metales en agua se observa que son los dos metales más disponible en las aguas ya que se presenta mayoritariamente en la fracción disuelta, sin embargo en los sedimentos se encuentra en la fase inerte lo que indica que en la bahía no se produce la removilización de Ni y Cr desde los sedimentos a las aguas; su presencia en las mismas probablemente es debida a aportes externos que la contaminan.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la disponibilidad de los metales en los sedimentos sigue el siguiente orden: $\text{Co} > \text{As} > \text{Ni} > \text{Cr}$, orden prácticamente inverso al que presenta el contenido total de metal en el sedimento. Así, el Cr es el metal con mayor concentración en el sedimento y el que se ha evaluado como menos disponible.

Con respecto a la especiación metálica en sedimentos también se realizaron tests estadísticos para evaluar las variaciones espaciales y estacionales. Así, se realizaron los estudios para todas las fracciones de la especiación, utilizando para ello los porcentajes de distribución, evaluando previamente su normalidad y la homocedasticidad de las varianzas. Con respecto a los muestreos, no hubo diferencias significativas para ninguna fracción, excepto para la del As oxidable, con la que se obtuvo un valor de $p < 0,05$ en el análisis de la varianza de Kruskal-Wallis, pero no se observó diferencia significativa cuando se realizó el test posterior de comparación múltiple para estudiar entre qué muestreos existía la diferencia. Por tanto, no fueron concluyentes los resultados para esta fracción metálica.

Por otra parte, se observaron diferencias significativas entre los puntos de muestreo 1 y 4, y 2 y 4 para la fracción de As reducible, que fue significativamente mayor en el punto 4 con respecto a los puntos 1 y 2. Los puntos 2 y 4 también fueron estadísticamente diferentes para la fracción de As residual, siendo el punto 2 el que presentaba mayor porcentaje de esta fracción. Se observaron diferencias significativas entre el punto 2 y 3 para la fracción de Ni intercambiable, predominando ésta en el punto 3. Asimismo, también se observaron diferencias significativas entre el punto 2 y 4 para las fracciones de Ni reducible, oxidable y residual. Las fracciones de Ni reducibles y oxidables fueron mayores en el punto 4, mientras que la residual fue mayor en el punto 2. Con respecto al Co, se encontraron diferencias significativas entre los puntos 1 y 4, y 2 y 4 para las fracciones intercambiable, reducible y residual. En este caso, el punto 4 fue el que presentaba una mayor fracción de Co intercambiable y reducible, mientras que en los puntos 1 y 2 predominó la fracción residual de este metal. Para el Cr no se observaron diferencias

significativas entre puntos de muestreo. No existieron tampoco diferencias significativas entre estaciones para ninguna fracción metálica en sedimentos.

Cuando se estudiaron las posibles correlaciones entre las fases de la especiación, y aplicando el test de Spearman (las distribuciones fueron no paramétricas), se encontraron correlaciones entre la mayoría de las fracciones metálicas. Las más significativas fueron las siguientes: correlaciones positivas para As intercambiable con As reducible, As reducible con Co intercambiable y con Co reducible, Ni reducible con Cr reducible, Ni residual con Co residual y Co reducible con Cr reducible. Las correlaciones negativas fueron As intercambiable con As residual, As reducible con As residual y con Co residual, As residual con Co intercambiable, Ni reducible con Ni residual, Ni oxidable con Ni residual y Co residual, Ni residual con Co reducible y Cr reducible, Co intercambiable con Co residual, Co reducible con Co residual y Cr oxidable con Cr residual. En resumen, las principales correlaciones positivas se dieron entre las fases intercambiable y reducible, mientras que las negativas se dieron entre estas fases y la fase residual del esquema de extracción secuencial.

4.9.3. Contenido metálico en muestras biológicas

En general, la fauna de los ecosistemas acuáticos se organiza en tres grupos en función de la zona donde viven [Artolachipi Acero y col., 2006]:

Pelágicas

Engloba a los animales capaces de nadar activamente a una velocidad que les permite ir contra corriente, pudiendo efectuar desplazamientos verticales y horizontales e incluso realizar largas migraciones. Es un nivel constituido por invertebrados marinos (cefalópodos y de determinados crustáceos decápodos) y vertebrados marinos, mamíferos marinos y peces adultos. La ictiofauna está formada principalmente por pequeños pelágicos planctívoros (boquerones y sardinas) y sus predadores (lubina, caballa, atunes blanco y rojo, pez espada, etc.).

Nectobentónicas o demersales

Son especies ligadas al fondo, ya sea porque encuentran sus posibles presas en el fondo o bien porque encuentran en el bentos refugio ante posibles depredadores. Son animales generalmente carnívoros adaptados a desplazamientos rápidos y cortos. Su coloración suele ser mixta entre la típica de las especies pelágicas y la críptica de los organismos bentónicos. Fundamentalmente se distingue una ictiofauna de hábitos alimenticios carnívoros, cuerpo fusiforme y con vejiga natatoria (merluza, hurta, voraz, pargo, etc.), cefalópodos (choco, choquito, calamar, etc.) y crustáceos (gamba, langostino, bogavante, etc.).

Bentónicas

Son aquellas especies fuertemente ligadas al fondo, en el que se pasan gran parte de su vida, siendo muy limitados los desplazamientos sobre él. Suelen ser especies territoriales, solitarias y con características morfológicas adaptadas a este modo de vida (colores crípticos para camuflarse en el fondo, estructuras especializadas a la sujeción al sustrato, ausencia de vejiga natatoria y cuerpo aplanado en los peces, etc.). Destaca la presencia de ictiofauna (rodaballo, lenguado, acedía, diversas especies de rayas, etc.), cefalópodos (pulpo), crustáceos (galera, centollo, buey de mar, etc.) y gasterópodos (cañaílla, bígaro, etc.) ya en los fondos cercanos a la costa.

En las distintas campañas de muestreo realizadas se capturaron, por las técnicas de pesca anteriormente citadas, una amplia variedad de especies de peces. De entre las capturas realizadas se decidió analizar para cada muestreo los peces que se indican a continuación:

Muestreo 1:

Getares: 1 sargo, 3 lenguados
Isla Verde: captura sin éxito
Palmones: 1 rubio
Guadarranque: captura sin éxito
Puente Mayorga: 1 rubio, 1 lenguado

Muestreo 2:

Getares: 14 lenguados, 1 sargo
Isla Verde: 3 lenguados
Palmones: 1 lenguado, 12 rubios
Guadarranque: 1 lenguado
Puente Mayorga: 3 lenguados

Muestreo 3:

Getares: 6 lenguados, 1 rubio, 4 rascacios
Isla Verde: 4 rascacios
Palmones: 2 rubios, 4 lenguados
Guadarranque: 3 rubios, 2 rascacios
Puente Mayorga: 1 rubio, 2 lenguados

Muestreo 4:

Getares: 7 lenguados, 1 rascacio, 1 sargo

Isla Verde: 2 sargos

Palmones: captura sin éxito

Guadarranque: 1 rubio, 2 lenguados, 3 rascacios

Puente Mayorga: captura sin éxito

En algunos puntos no se obtuvieron ejemplares durante el muestreo a pesar del interés de los pescadores en ello. No obstante, se obtuvieron muy diversos ejemplares para realizar el estudio.

En el Anexo 3, en la Tabla A.4 se muestran el tamaño y peso de los peces capturados en las distintas campañas de muestreo.

En este estudio se han seleccionado especies fuertemente ligadas al fondo (bentónicas) como son los lenguados (*Solea senegalensis*) y especies cuyo hábitat está ligeramente ligado al fondo marino como ocurre con las especies neobentónicas o demersales, como rubios (*Trigloporus lastoviza*), rascacios (*Scorpaena porcus*) y sargos (*Diplodus sargas sargus*).

- Lenguado: *Solea senegalensis* (Kaup, 1858)

El lenguado, *Solea senegalensis*, pertenece a la familia de los Soleidos, que comprende unos treinta géneros (todos ellos dextrógiros) de cuerpo oval y alargado, con la cabeza redonda y poco saliente, caracterizados por poseer un hocico redondo y carnoso, con una pequeña boca arqueada y que se abre hacia abajo, sin dientes palatinos; la mandíbula superior está más desarrollada que la inferior. Los ojos son muy pequeños y próximos y se sitúan en el flanco derecho. Las escamas del tronco continúan por la cabeza.

La especie *Solea senegalensis*, perteneciente a la fauna bentónica, se caracteriza por tener el tubo nasal anterior del lado ciego alejado del borde cefálico; la aleta pectoral derecha redondeada y subsimétrica con una membrana interraccial negra, el último radio de las aletas dorsal y anal está unido al pedúnculo caudal por una membrana y la aleta dorsal se inicia por delante del ojo dorsal. La coloración de fondo del lado ocular es variable, adaptándose miméticamente al entorno predominante en el sustrato: normalmente varía de un marrón verdoso oscuro a un marrón rojizo claro, casi anaranjado; presenta ocelos de color azul de tamaño variable, dispuestos en filas longitudinales, a veces no muy claros, que desaparecen rápidamente con la muerte del animal; manchas marrón oscuro dispuestas en la línea media del cuerpo, de tamaño mediano, y otras más pequeñas en filas transversales. Los ojos son de color verde metálico en vivo (Figura 4.40).

La distribución geográfica de la especie *Solea senegalensis* se limita a la costa oeste africana y a la costa europea del Atlántico y Mediterráneo Occidental. En el Atlántico, se

extiende desde Senegal hasta la península Escandinava. En el Mediterráneo, se localiza en el sur de España y al norte de Túnez [Arellano y col., 2005].

El lenguado es un teleósteo con sexos separados, sin caracteres sexuales externos diferenciales, madurando por primera vez entre el tercer y cuarto año de vida (25-30 cm de longitud). El índice de fecundidad de la hembra, en la naturaleza, alcanza el millón de óvulos por kilogramos. La época de puesta se sitúa entre marzo y abril, pudiendo extenderse hasta el mes de junio. Los huevos miden entre 0,9 y 1,5 mm, son pelágicos y la temperatura del agua durante la época de puesta suele ser superior a 16°C. La larva pelágica y simétrica, durante los dos primeros años, mide en el momento de la eclosión entre 2,5 y 3,1 mm. Las larvas en la naturaleza (10-15 m de profundidad) son arrastradas por las corrientes hacia la costa, realizan la metamorfosis (se vuelven disimétricas) y descienden hasta el fondo. Los lenguados cultivados miden $16,6 \pm 2,1$ cm y pesan $40,3 \pm 2,5$ g, un año después de la eclosión. Son animales de hábitos básicamente nocturnos, predadores bentónicos (anélidos, moluscos) viven enterrados en la arena durante el día, y su ritmo de crecimiento es regular teniendo unos 300 g y 30 cm al tercer año, pudiendo alcanzar una talla máxima de 60 cm y 800 g de peso [Arellano y col., 2005].



Figura 4.40. *Solea Senegalensis* (Kaup, 1858)

- Rubio: *Trigloporus lastoviza* (Bonnaterre, 1788)

El rubio, *Trigloporus lastoviza*, es un pez de la familia de los Triglidae. Es de coloración rojiza, con aletas pectorales también rojizas, su cara interna con manchas oscuras y la externa violácea manchada de azul. La línea lateral está cubierta de ásperas escamas. Armado de placas córneas espinosas. Esta especie alcanza unos 40 cm de longitud. Tiene la cabeza maciza, fuerte, acorazada por placas óseas y fuertes espinas operculares y en el

rostro. Se valen de sus largos radios libres pectorales, que le sirven de órganos sensoriales, para detectar las presas enterradas en el fondo (Figura 4.41). Son carnívoros.

Viven sobre el fondo, entre los 50 y los 200 metros de profundidad, en fondos arenosos, limosos o fangosos. Durante los veranos se acercan a las costas.

Su área de distribución se centra en el Atlántico, costas africanas hasta Gran Bretaña y Mediterráneo [Boudaya, 2000].



Figura 4.41. *Trigloporus lastoviza* (Bonnaterre, 1788)

- Rascacio: *Scorpaena porcus* (Linnaeus, 1758)

El rascacio, *Scorpaena porcus*, es un pez de la familia de los Escorpénidos. Es un pez robusto, de hasta 25 cm de longitud y de color críptico, por lo tanto muy variable, aunque suele ser pardo o negruzco con tintes rojizos y manchas claras. Las diferentes especies se distinguen por los apéndices que presentan en la cabeza, sus pliegues dérmicos y por su tamaño. Su boca es muy amplia y sobrepasa la vertical del ojo. Tienen la cabeza grande, cubierta de espinas y apéndices dérmicos, con una fosa nugal. Los ojos son ovalados y tienen apéndices supraorbitales tan largos como el diámetro del ojo. Tiene dos espinas preorbitales y otras dos supraorbitales. También tienen un apéndice en las aberturas nasales. La aleta caudal presenta 3 bandas transversales oscuras, y entre los radios 8 y 9 de la dorsal, presenta una mancha oscura (Figura 4.42).

Son especies sedentarias, con glándulas venenosas, indolentes y dotadas de poca movilidad. Vive sobre fondos preferentemente rocosos o coralinos, en los que permanecen estáticos y mimetizados para capturar a sus presas.

Su distribución geográfica se limita a las costas marroquíes, el Mar Mediterráneo y desde las Islas Británicas a las Azores [Linnaeus, 1758; Valledor de Lozoya, 1994].



Figura 4.42. *Scorpaena porcus* (Linnaeus, 1758)

- Sargo: *Diplodus sargus sargus* (Linnaeus, 1758)

El sargo común, *Diplodus sargus sargus*, es un pez de la familia de los Espáridos, muy común en el Mar Mediterráneo. El nombre del género viene del griego diplos y odous, palabras que significa doble y diente, en alusión a que tienen dos tipos de dientes: incisivos y molares.

El sargo tiene el cuerpo comprimido lateralmente y ovalado. Alcanza una longitud media de 25 cm, con un máximo de 40 cm. Su color es gris, claro u oscuro según sus necesidades de camuflaje, con reflejos plateados. Los jóvenes tienen bandas oscuras verticales en costados, que se van difuminando con la edad y llegan a desaparecer en los ejemplares grandes, la última de ellas en el mismo pedúnculo de la cola es la más gruesa y oscura, ésta no desaparece. Tiene una docena de espinas en la aleta dorsal y tres espinas en la anal. La aleta caudal tiene una orla negra. La boca es más larga que el diámetro del

ojo. Los dientes incisivos son planos y afilados mientras que los molares posteriores trituran (Figura 4.43).

Se distribuyen por toda la costa este del océano Atlántico hasta Sudáfrica, así como por todo el mar Mediterráneo y el mar Negro.

De jóvenes viven en bancos numerosos de pequeños sargos muy cerca de la orilla, frecuentes en puertos, arrecifes y junto a las rocas de rompiente, así como en prados de Posidonia, a veces penetran en aguas salobres. Los adultos son solitarios y viven en el mar entre los 0 y los 50 m de profundidad. Frecuentan la zona del rompeolas, sobre todo de madrugada.

Al igual que otros muchos espáridos, los sargos son hermafroditas. Se alimenta de moluscos y otros pequeños invertebrados bentónicos que desentierra del sedimento. Tritura las conchas de los moluscos con sus fuertes molares [Riede, 2004].



Figura 4.43. *Diplodus sargus sargus* (Linnaeus, 1758)

Los resultados obtenidos en el análisis de los metales estudiados para cada uno de los tejidos y en todos los puntos de muestreo se recogen en la Tabla 4.23, expresados como media en mg/kg de peso seco. Los valores completos se encuentran detallados en la Tabla A.10 del Anexo 4.3.

Tabla 4.23. Intervalos y valores medios de concentración de los metales estudiados en muestras biológicas para cada estación de muestreo (mg/kg de peso seco)

Estación de Muestreo	Tejido	Intervalos y valores medios (mg/kg)			
		As	Ni	Co	Cr
Playa de Getares	Hígado (n=32)	(4,32-225,33) 33,09±45,96	(0,02-13,85) 0,62±2,42	(0,07-6,35) 0,66±1,18	(<LD-16,65) 0,59±2,93
	Branquias (n=40)	(0,31-21,53) 5,66±3,86	(<LD-1,84) 0,52±0,47	(0,02-1,84) 0,25±0,28	(<LD-2,62) 0,74±0,65
	Músculo (n=40)	(3,85-84,66) 36,63±21,88	(<LD-2,34) 0,17±0,37	(0,01-0,73) 0,06±0,11	(<LD-0,69) 0,27±0,18
Isla verde	Hígado (n=8)	(3,37-168,58) 34,73±56,02	(0,02-0,36) 0,19±0,12	(0,11-4,04) 1,12±1,26	(<LD-0,56) 0,09±0,19
	Branquias (n=9)	(3,34-44,25) 12,73±12,10	(0,07-1,48) 0,49±0,41	(0,12-0,72) 0,36±0,19	(0,01-2,40) 0,54±0,72
	Músculo (n=8)	(7,57-165,93) 47,66±52,81	(<LD-0,32) 0,10±0,13	(0,02-0,26) 0,08±0,08	(0,02-0,39) 0,22±0,12
Palmones	Hígado (n=18)	(2,50-71,33) 21,56±18,54	(0,02-0,69) 0,24±0,21	(0,18-4,55) 1,88±1,27	(<LD-0,75) 0,10±0,18
	Branquias (n=18)	(<LD-37,63) 14,12±10,72	(<LD-1,14) 0,57±0,28	(<LD-0,96) 0,52±0,23	(<LD-2,48) 0,94±0,74
	Músculo (n=21)	(<LD-130,32) 27,75±29,41	(<LD-0,43) 0,05±0,10	(<LD-3,48) 0,25±0,74	(<LD-0,51) 0,14±0,12
Guadarranque	Hígado (n=11)	(1,30-28,99) 11,80±8,95	(0,03-1,43) 0,42±0,44	(0,04-10,29) 1,62±3,13	(<LD-0,11) 0,04±0,04
	Branquias (n=12)	(2,38-20,02) 7,30±5,51	(0,20-2,66) 0,75±0,71	(0,13-1,66) 0,61±0,44	(<LD-1,74) 0,64±0,55
	Músculo (n=11)	(8,34-58,56) 27,28±16,32	(<LD-0,43) 0,14±0,18	(0,02-0,21) 0,12±0,06	(0,10-1,99) 0,48±0,53
Puente Mayorga	Hígado (n=7)	(5,22-376,73) 82,88±131,83	(<LD-0,54) 0,27±0,23	(0,12-11,04) 1,90±4,04	(0,05-0,23) 0,13±0,08
	Branquias (n=8)	(1,83-79,79) 20,10±25,24	(0,06-0,73) 0,35±0,25	(0,19-6,70) 1,21±2,25	(0,09-1,28) 0,56±0,43
	Músculo (n=7)	(18,36-135,06) 73,88±49,87	(<LD-0,56) 0,14±0,21	(0,01-0,13) 0,04±0,04	(0,11-0,61) 0,32±0,21

Hay que destacar que durante el muestreo 1 no se tomaron peces en las estaciones 2 y 4, ni de las estaciones 3 y 5 en el muestreo 4.

Como se observa en los datos de la Tabla 4.23, el As se acumuló en el hígado y los músculos, seguido de las branquias en menor medida. Los niveles de As en los peces fueron similares en todas las estaciones de muestreo excepto en Puente Mayorga, próximo al sector industrial, donde se obtuvieron los mayores valores medios de As de este estudio

en el tejido de hígado durante el muestreo 1 en otoño de 2007 (376,73 mg/kg) y en Getares durante el muestreo 2 en primavera de 2008 (225,33 mg/kg). También destacó el punto de Isla Verde en el muestreo 2 en hígado (168,58 mg/kg) y en músculo (165,93 mg/kg). En general, el contenido de As en los peces fue mayor en primavera que en otoño.

A partir de los valores medios, se concluye que la mayor acumulación de Ni en los peces ocurría principalmente en las branquias e hígado y en menor medida en músculo. Con respecto a los puntos de muestreo no se observaron grandes diferencias entre puntos aunque hay que indicar que los mayores niveles de Ni fueron hallados en hígado de peces capturados en Getares durante el muestreo 2 (13,85 mg/kg), así como en branquias de peces capturados en Guadarranque durante el muestreo 4 (2,66 mg/kg). En general, no se observó influencia estacional en los niveles de Ni.

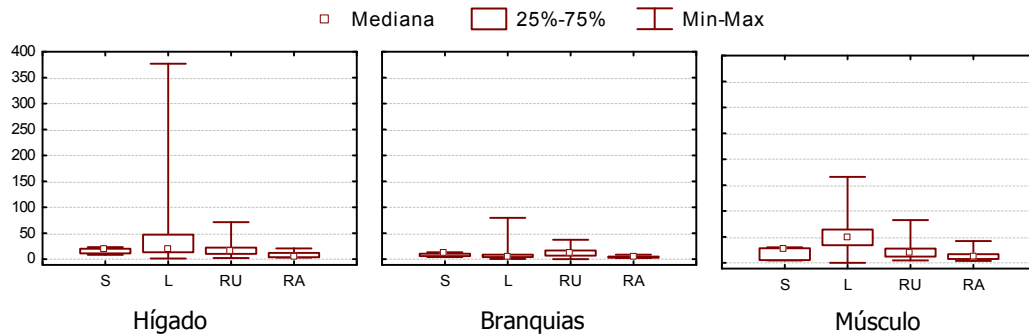
Respecto a los niveles de Co, se observó que el metal se acumulaba preferentemente en los tejidos de hígado, seguido de las branquias y músculo. Los valores más elevados se hallaron en las estaciones de muestreo de Guadarranque y Puente Mayorga (próximos los dos al sector industrial de la comarca) en los tejidos de hígado (11,04 mg/kg en Guadarranque y 10,29 mg/kg en Puente Mayorga) y branquias (6,70 mg/kg en Puente Mayorga).

Atendiendo a los valores medios, se pueden ordenar los niveles de Cr encontrados en los distintos tejidos de mayor a menor como sigue: branquias > músculo > hígado, aunque hubo ocasiones en las que no se observó este orden. Así en la estación de Getares para los peces capturados en el muestreo 2, se observó una mayor acumulación de este metal en hígado (16,65 mg/kg), aunque este valor parece un dato anómalo. Además, destacaron los valores obtenidos en las branquias, en Getares, Isla Verde y Palmones (2,62; 2,4 y 2,48 mg/kg, respectivamente).

Para estudiar las diferentes especies de peces que fueron capturadas durante los muestreos, se calcularon los valores medios de As, Ni, Co y Cr para cada una de ellas en los tejidos de hígado, branquias y músculo (Tabla 4.24), y se han representado las cajas de Box-Whisker correspondientes en las Figuras 4.44, 4.45, 4.46 y 4.47.

Tabla 4.24. Intervalos y valores medios de concentración de los metales estudiados en muestras biológicas para cada especie de pez

Pez	Tejido	Intervalos y valores medios (mg/kg)			
		As	Ni	Co	Cr
Lenguado	Hígado (n=40)	(1,30-376,73) 46,13±71,39	(<LD-13,85) 0,56±2,16	(0,04-2,72) 0,39±0,51	(<LD-16,65) 0,52±2,62
	Branquias (n=46)	(0,31-79,79) 9,60±13,13	(<LD-2,66) 0,60±0,55	(0,02-6,70) 0,36±0,96	(0,04-2,62) 0,89±0,71
	Músculo (n=46)	(<LD-165,93) 53,46±34,16	(<LD-0,56) 0,11±0,14	(<LD-0,09) 0,03±0,02	(<LD-0,61) 0,26±0,18
Rascacio	Hígado (n=11)	(3,37-20,90) 8,29±5,48	(0,02-0,79) 0,20±0,23	(0,27-4,04) 0,99±1,09	(<LD-0,06) 0,03±0,03
	Branquias (n=15)	(2,38-8,89) 4,20±2,14	(0,07-1,25) 0,42±0,29	(0,12-0,72) 0,38±0,17	(0,01-0,81) 0,33±0,26
	Músculo (n=15)	(3,85-42,03) 15,34±10,90	(<LD-0,43) 0,10±0,14	(0,03-0,26) 0,11±0,07	(0,03-0,69) 0,29±0,17
Rubio	Hígado (n=20)	(2,50-71,33) 20,81±17,65	(0,02-1,43) 0,30±0,31	(0,14-11,04) 3,22±2,97	(0,06-0,23) 0,06±0,07
	Branquias (n=21)	(<LD-37,63) 14,03±9,46	(<LD-1,14) 0,49±0,31	(<LD-1,66) 0,69±0,38	(<LD-2,48) 0,69±0,65
	Músculo (n=21)	(4,68-82,57) 22,10±16,89	(<LD-0,43) 0,06±0,11	(0,06-3,48) 0,27±0,74	(0,04-1,99) 0,28±0,43
Sargo	Hígado (n=5)	(8,58-23,25) 16,46±6,21	(0,05-0,71) 0,32±0,25	(0,11-1,97) 0,82±0,69	(<LD-0,10) 0,06±0,04
	Branquias (n=5)	(4,27-13,25) 8,89±3,70	(0,24-1,34) 0,60±0,45	(0,12-1,84) 0,58±0,71	(0,04-0,85) 0,54±0,19
	Músculo (n=5)	(4,77-29,92) 18,64±12,49	(<LD-2,34) 0,65±0,95	(0,01-0,73) 0,18±0,31	(<LD-0,48) 0,25±0,17

**Figura 4.44.** Caja de Box-Whisker de As (mg/kg) en sargos (S), lenguados (L), rubios (Ru) y rascacios (Ra) de la Bahía de Algeciras, para hígado, branquias y músculo

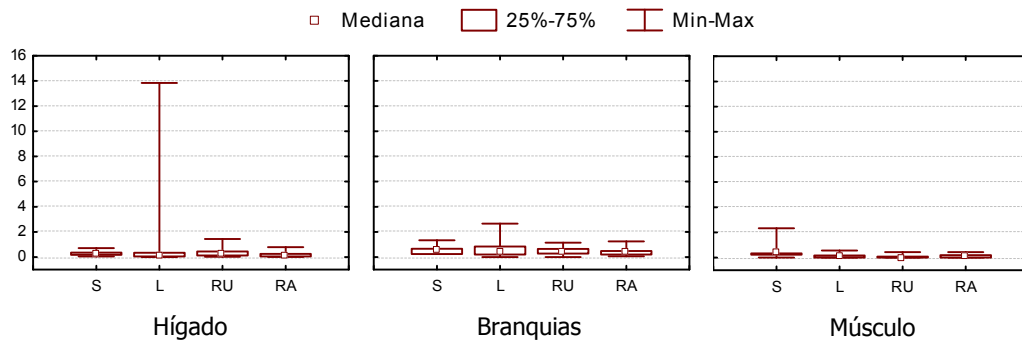


Figura 4.45. Caja de Box-Whisker de Ni (mg/kg) en sargos (S), lenguados (L), rubios (Ru) y rascacios (Ra) de la Bahía de Algeciras, para hígado, branquias y músculo

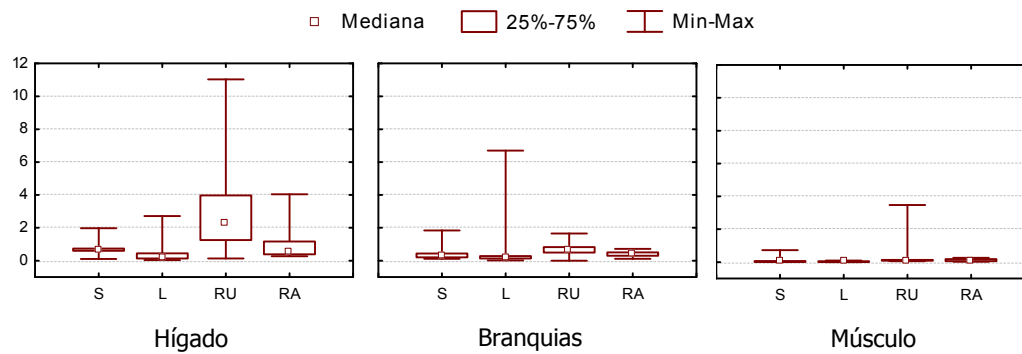


Figura 4.46. Caja de Box-Whisker de Co (mg/kg) en sargos (S), lenguados (L), rubios (Ru) y rascacios (Ra) de la Bahía de Algeciras, para hígado, branquias y músculo

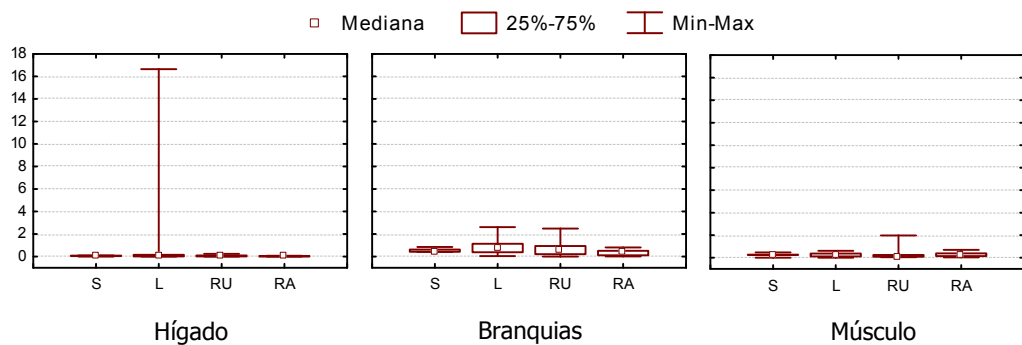


Figura 4.47. Caja de Box-Whisker de Cr (mg/kg) en sargos (S), lenguados (L), rubios (Ru) y rascacios (Ra) de la Bahía de Algeciras, para hígado, branquias y músculo

Se observó que el As se acumulaba mayoritariamente en hígados y músculos de las 4 especies, encontrándose la mayor concentración de este metal en lenguados. En cuanto al Ni, presentó una tendencia a acumularse en hígados y branquias de lenguados, rascacios y rubios, mientras que en sargos los mayores niveles se encontraron en branquias y músculo. Las especies que presentaron una mayor concentración de Ni fueron el lenguado y el sargo. El Co por su parte se acumulaba preferentemente en hígados y branquias de todas las especies, destacando la alta concentración que se encontró en el hígado de los rubios. Por último, el Cr se acumulaba en hígados y branquias de los lenguados, y en branquias y músculos de rascacios, rubios y sargos. La especie que presentó una mayor concentración de Cr fue el lenguado. En general puede afirmarse que el lenguado en la Bahía de Algeciras se vio más afectado por la contaminación metálica de As, Ni y Cr, mientras que el Co afectaba más al rubio. Según los datos obtenidos, se pueden ordenar los metales según la concentración encontrada en los peces en el siguiente orden: $As \gg Co > Ni \geq Cr$. Este orden fue inverso al encontrado para el contenido de metal total en el sedimento, pero se relaciona directamente con los niveles de metales más disponibles en este compartimento.

A partir de los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente las diferencias entre los distintos tejidos estudiados, encontrándose que todos fueron diferentes de forma significativa entre sí para los 4 metales, a excepción de las branquias e hígado en el caso del Co, donde no se encontró diferencia alguna. Además, también se estudió si existían diferencias significativas en la acumulación metálica entre las especies, hallándose diferencias entre lenguados y rascacios, y rascacios y rubios para el As, y entre lenguados y rascacios, y lenguados y rubios para el Co. Estos datos estadísticos corroboraron los resultados presentados en la Tabla 4.24, en donde se observaron para el As mayores concentraciones medias en lenguados y rubios, y menores concentraciones en rascacios. Para el Co, los valores medios mayores se encontraron en los rubios, mientras que los más bajos se hallaron en lenguados. Para el Ni y el Cr no se encontraron diferencias significativas entre las especies.

Los siguientes estudios estadísticos que se llevaron a cabo se realizaron de forma conjunta para aquellos metales en los que no se encontraron diferencias entre las especies (Ni y Cr); sin embargo aquellos metales (As y Co) que presentaron diferencias en su acumulación entre las especies requirieron de estudios individualizados para cada especie, ya que no se podría asumir que las conclusiones de los estudios realizados de manera conjunta fueran igualmente válidos para las dos especies.

Así, se evaluó la posible influencia espacial y temporal de los metales Ni y Cr en las 4 especies de peces, diferenciando entre los tres tejidos. Los resultados obtenidos se pueden resumir como sigue:

- Comparación entre muestreos: para Ni existieron diferencias significativas entre los muestreos 3 y 4 en el caso de las branquias; para músculo el muestreo 4 fue diferente

al 2 y al 3. En el caso de hígados no se encontraron diferencias significativas entre muestreos. Para el Cr se encontró que el muestreo 3 era diferente a todos los restantes en el caso de las branquias; para el hígado se encontraron diferencias entre los muestreos 1 y 3, y para músculo el muestreo 2 era diferente al 1 y al 4.

- Comparación entre puntos de muestreo: no existieron diferencias entre puntos de muestreo para el Ni con respecto a la acumulación en branquias, hígado y músculo, ni tampoco para el Cr con respecto a branquias e hígado. Sin embargo, se observó que el punto de muestreo 3 era diferente a los puntos 1 y 4 con respecto a la acumulación en músculo, siendo el punto 3 el que presentaba una menor concentración de Cr en músculo, y el punto 4 el que presentaba una mayor concentración de este metal en dicho tejido.

Para el As y el Co se evaluó la posible influencia espacial y temporal diferenciando entre los tejidos estudiados y las especies de peces que presentaban diferencias significativas entre sí. Así, no se detectaron diferencias entre puntos de muestreo para los tejidos de lenguados, rascacios o rubios tanto para As como Co. Sí se dieron algunas diferencias entre muestreos, aunque solo para tejidos de lenguados, tales como:

- Para As se encontró que el muestreo 2 era diferente al 3 y 4 en el caso de las branquias; para hígado se encontraron diferencias significativas entre el muestreo 2 y el 4; en el caso de músculo, se encontró diferencia significativa entre los muestreos 2 y 3. Para el Co se encontró que el muestreo 4 era diferente al 2 y al 3 en el caso de las branquias; para el hígado se encontraron diferencias entre los muestreos 3 y 4; y para músculo el muestreo 1 fue diferente al 4.

Se compararon los niveles medios encontrados en peces de la Bahía de Algeciras con otros ecosistemas, encontrando la siguiente información:

- Existen estudios de niveles metálicos en tejidos de lenguados que se realizaron en un ecosistema próximo al de la Bahía de Algeciras, como es la Bahía de Cádiz. En esta bahía se encontraron valores medios de As en hígado, branquias y músculo de 21,53; 24,88 y 34,33 mg/kg, respectivamente. También se estudiaron estos niveles en la Ría de Huelva resultando ser de 14,56 mg/kg en hígado, 13,83 mg/kg en branquias y 10,61 mg/kg en músculo [Vicente Martorell, 2010]. Tanto los valores medios en Cádiz como en Huelva resultaron ser ligeramente más bajos que los encontrados en los lenguados de la Bahía de Algeciras durante este estudio.

- Los valores de Ni en lenguados de la Bahía de Cádiz, para hígado, branquias y músculo fueron $0,785 \pm 0,051$ mg/kg, $0,785 \pm 0,039$ mg/kg y $0,050 \pm 0,007$ mg/kg, respectivamente [Galindo y col., 2012]. Estos valores medios son similares a los encontrados en nuestro estudio.

- Las concentraciones de Co encontradas en el hígado, branquias y músculo de lenguados de la Bahía de Cádiz fueron $0,045 \pm 0,006$ mg/kg, $0,096 \pm 0,002$ mg/kg y $0,014 \pm 0,003$ mg/kg, respectivamente [Galindo y col., 2012]. Estos valores encontrados para hígado y branquias en lenguados de la Bahía de Cádiz son mucho menores a los hallados en este estudio. Sin embargo, las concentraciones medias en músculo son similares en ambos ecosistemas.

- Los valores de Cr en lenguados de la Bahía de Cádiz para hígado, branquias y músculo fueron $0,545 \pm 0,118$ mg/kg, $0,467 \pm 0,013$ mg/kg y $0,0144 \pm 0,0001$ mg/kg, respectivamente [Galindo y col., 2012]. Comparando estos valores con los resultados en este estudio se puede observar que las concentraciones medias para hígados son similares en ambos ecosistemas, sin embargo las concentraciones encontradas en branquias y músculo en la Bahía de Cádiz son menores que las encontradas en la Bahía de Algeciras en este estudio.

- Por otra parte, se han estimado las concentraciones de As en hígados y músculo de sargos de la Ría Formosa, en el sur de Portugal. Estas concentraciones oscilaban entre $12,24 \pm 0,81$ mg/kg para hígado, y $12,19 \pm 1,48$ mg/kg para músculo [Ferreira y col., 2008], valores muy similares a los encontrados en este estudio para los sargos de la Bahía de Algeciras.

4.10. Comparación del contenido metálico

En la sección anterior se ha estudiado la distribución metálica en las aguas y sedimentos, así como su acumulación en los tejidos de 4 especies de peces. En esta sección, con el objetivo de conocer el grado de contaminación que presenta el ecosistema de la Bahía de Algeciras, se explican los estudios comparativos de los resultados obtenidos que se han realizado en cada uno de los compartimentos medioambientales analizados. En primer lugar, se han comparado entre sí las 5 estaciones de muestreo seleccionadas mediante unos índices de contaminación que se detallarán a continuación. Y en segundo lugar, se ha realizado la comparación de los resultados obtenidos para cada metal con aquellos niveles de referencia o legales recogidos en la bibliografía.

4.10.1. Comparación entre los puntos de muestreo

Un índice de un ecosistema es un indicador que informa sobre las condiciones y/o características del sistema de tal manera que la información que suministre sea interpretada con facilidad. Para comparar el contenido metálico en los cinco puntos de

muestreo, en agua, sedimento y tejidos de peces, se ha calculado el índice de contaminación metálica (MPI: *metal pollution index*), usando la siguiente ecuación [Usero y col., 1996; Usero y col., 1997; Usero y col., 2005, Chaudhuri y col., 2007]:

$$MPI = (Cf_1 \times Cf_2 \times \dots \times Cf_n)^{1/n}$$

donde Cf_n es la concentración del metal n en la muestra. Este índice ha sido ampliamente utilizado en estudios de biomonitorización en ecosistemas acuáticos [Giusti, 1999], estudios de contaminación en sedimentos [Roychoudhury y col., 2006; Das y Chakrapani, 2011; Varol, 2011] así como en estudios atmosféricos y con vegetales [Sharma y col., 2008].

En las Figuras 4.48 y 4.49 se recogen los índices de contenido metálico en aguas, los cuales han sido calculados utilizando los valores de As, Ni, Co y Cr total y disuelto para las 5 estaciones de muestreo. Cada término Cf representa la concentración metálica media calculada para las 4 campañas de muestreo. Con estos índices se observa claramente que los puntos de muestreo de Palmones y Guadarranque presentan un contenido metálico mayor que el resto de las estaciones estudiadas. Esta conclusión era de esperar puesto que estas dos estaciones se encuentran cercanas a la zona industrial de la Bahía de Algeciras.

El índice de contenido metálico en sedimentos se representa en la Figura 4.50. En este caso se observa que en los sedimentos de las estaciones de Palmones, Guadarranque y Puente Mayorga exista una mayor contaminación metálica.

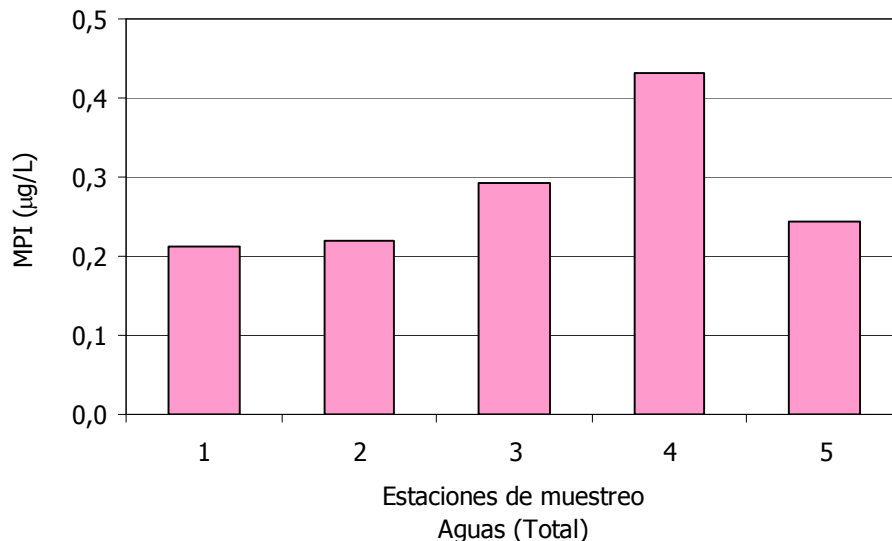


Figura 4.48. Índice de contaminación metálica para el contenido total en agua en las estaciones de muestreo estudiadas

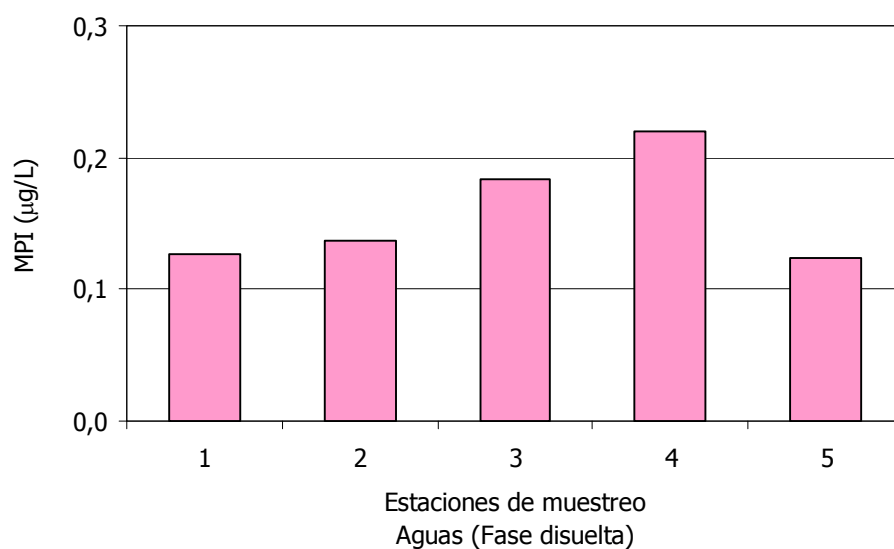


Figura 4.49. Índice de contaminación metálica para el contenido disuelto en agua en las estaciones de muestreo estudiadas

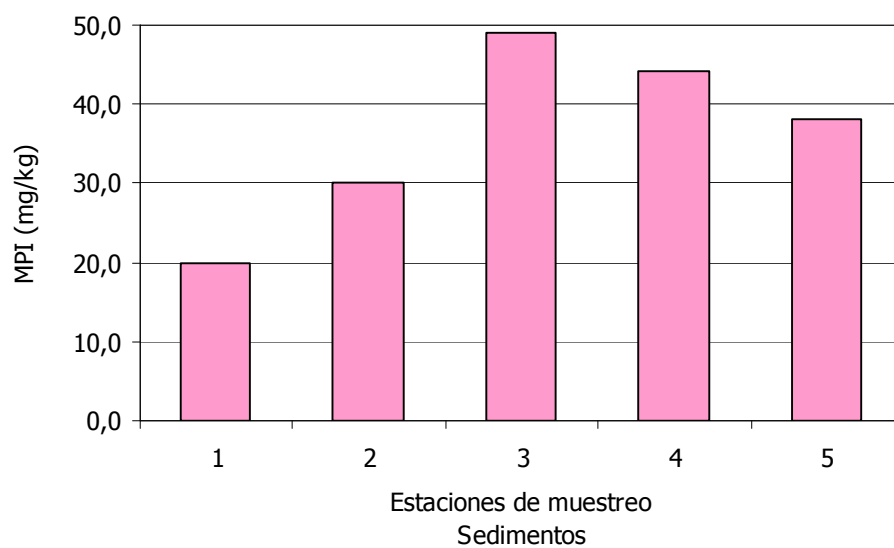


Figura 4.50. Índice de contaminación metálica para sedimentos en las estaciones de muestreo estudiadas

En las Figuras 4.51 a 4.54 se muestran los índices de contenido metálico para los tejidos de peces, calculados éstos como valor medio para cada especie y como valor medio para cada uno de los tejidos individuales. Los índices de contenido metálico medio para cada especie son mayores en las estaciones de muestreo de Guadarranque y Puente Mayorga, siendo el lenguado la especie que presenta una mayor contaminación en las estaciones de Getares e Isla Verde, y el rubio, en Palmones, Guadarranque y Puente Mayorga.

A partir de los MPI calculados para cada tejido se pueden ordenar éstos por orden de acumulación como sigue branquias > hígado > músculo, para lenguados; branquias > músculo ≥ hígado para rascacio y sargo; e hígado > branquias > músculo para rubios.

En general, se puede concluir que el hígado y las branquias son los tejidos diana, en los que se produce de manera más significativa la acumulación de los metales biodisponibles en el medio, y cuyo contenido permite diferenciar entre ecosistemas con distinto grado de contaminación. Mientras que la bioacumulación en el músculo es menos importante y por tanto es menos discriminante para evaluar diferencias de contaminación entre ecosistemas.

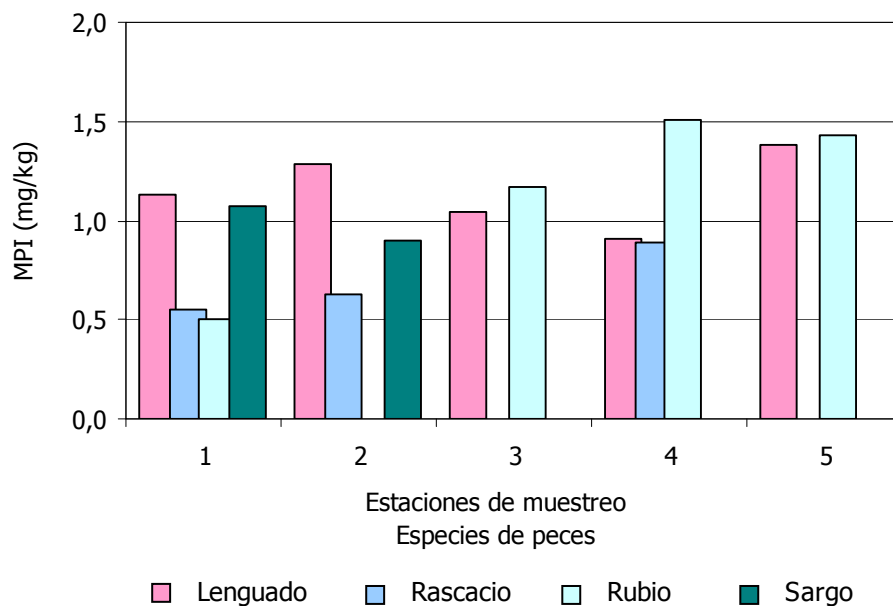


Figura 4.51. Índice de contaminación metálica media para lenguados, rascacios, rubios y sargos en las estaciones de muestreo estudiadas

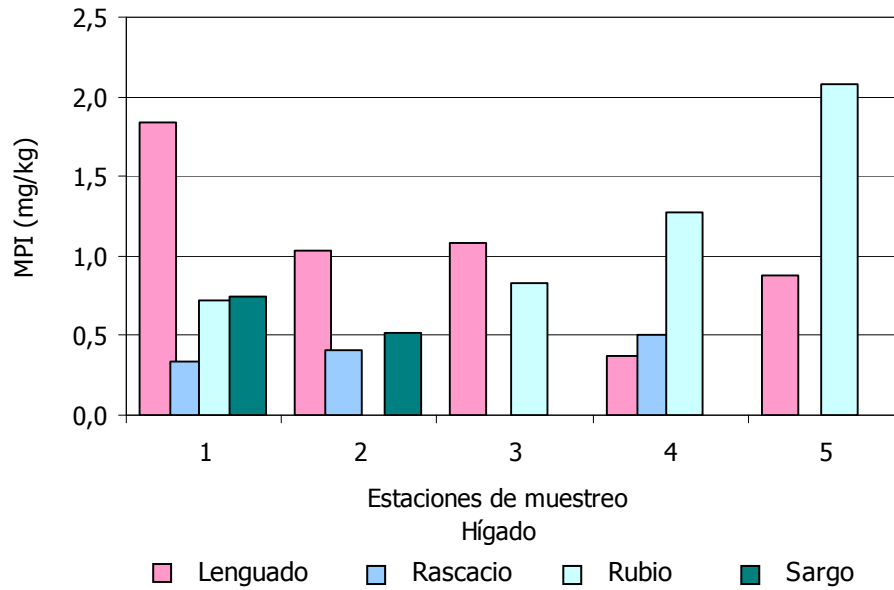


Figura 4.52. Índice de contaminación metálica media para hígado de lenguados, rascacios, rubios y sargos en las estaciones de muestreo estudiadas

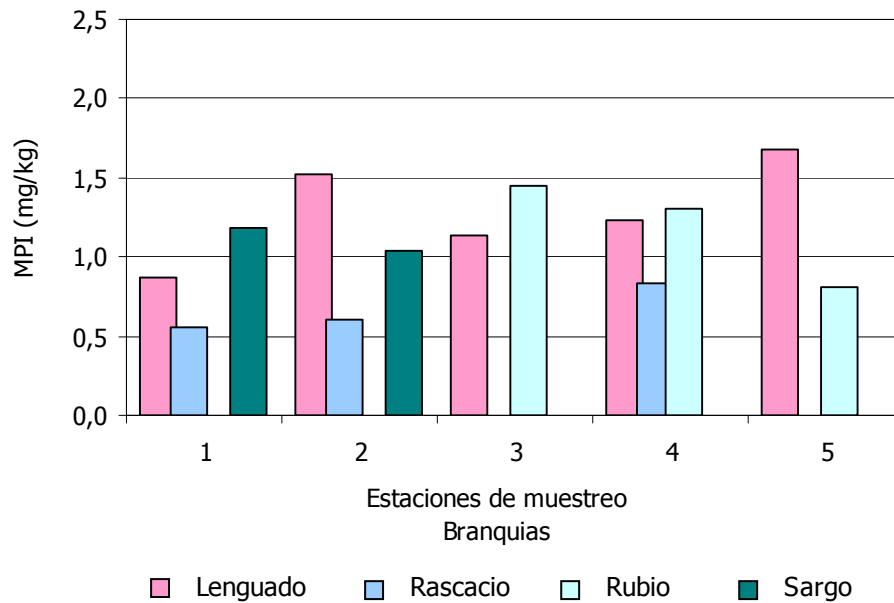


Figura 4.53. Índice de contaminación metálica media para branquias de lenguados, rascacios, rubios y sargos en las estaciones de muestreo estudiadas

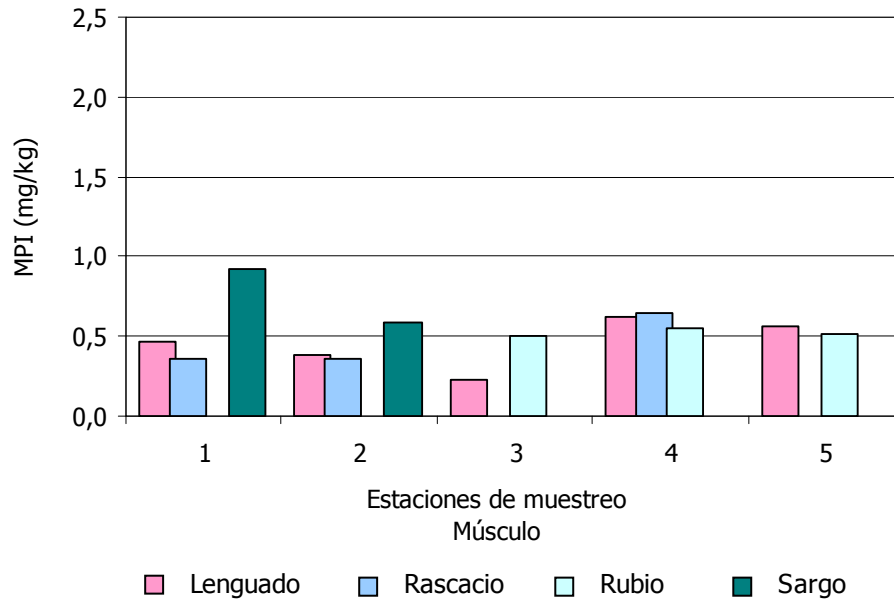


Figura 4.54. Índice de contaminación metálica media para músculo de lenguados, rascacios, rubios y sargos en las estaciones de muestreo estudiadas

A continuación, con objeto de estimar el impacto antropogénico sobre los sedimentos de la Bahía de Algeciras y comparar el alcance de la contaminación metálica de los sedimentos entre los distintos puntos de muestreo, se han calculado los siguientes indicadores de contaminación, en los que se tiene en cuenta los niveles de fondo ampliamente aceptados, como los valores medios de rocas sedimentarias continentales (Tabla 4.25) o abundancia en la corteza terrestre [Turekian y Wedepohl, 1961; Christophoridis y col., 2009; Wedepohl, 1995]:

Factor de enriquecimiento (EF: enrichment factor)

$$EF = \frac{M_x \cdot Fe_b}{M_b \cdot Fe_x}$$

donde M_x y Fe_x son las concentraciones de metal (mol/L) y Fe en la muestra y M_b y Fe_b son los niveles de fondo del metal y de Fe en esquistos, respectivamente. El hierro o el aluminio se utilizan como elementos de normalización para reducir las posibles variaciones en los datos producidas por heterogeneidad en los sedimentos. Este elemento de

referencia debe presentar una variabilidad mínima de ocurrencia o concentraciones muy altas en el ecosistema de estudio [Abraham y Parker, 2008; Christophoridis y col., 2009]. Por ello, se han evaluado los contenidos totales de hierro en los sedimentos y se han aplicado estos valores en el cálculo del factor de enriquecimiento.

Factor de contaminación (CF: contamination factor)

El factor de contaminación es una herramienta muy útil para el seguimiento de la contaminación durante un periodo de tiempo determinado [Turekian y Wedepohl, 1961; Loska y col., 1997]. Se calcula de la siguiente manera:

$$CF = \frac{\text{Concentración de metal en la muestra}}{\text{Nivel de fondo}}$$

Índice de geoacumulación (I_{geo} : geoaccumulation index)

El índice de geoacumulación se basa en datos geoquímicas y hace posible la clasificación de las zonas según su grado de contaminación. I_{geo} se calcula con la siguiente ecuación:

$$I_{geo} = \log_2 \left(\frac{C_n}{1,5 \cdot B_n} \right)$$

donde C_n es la concentración medida del metal y B_n es el nivel de fondo de esquistos continentales. El factor 1,5 incluye las posibles variaciones de los datos debido a efectos litogénicos [Christophoridis y col., 2009; Abraham y col., 2008; Loska y col., 1997; Anagnostou y col. 1997]. Los criterios de estos indicadores de contaminación se explican en la Tabla 4.26.

Tabla 4.25. Valores medios de roca sedimentaria continental (mg/kg) [Turekian y Wedepohl, 1961]

Metal	Concentración en esquistos (mg/kg)
As	13
Ni	68
Co	19
Cr	90
Fe	47000

Tabla 4.26. Criterio de indicadores de contaminación en sedimentos basados en EF, CF e I_{geo}

EF	Estado de contaminación	CF	Estado de contaminación	I_{geo}	Estado de contaminación
>1	Presencia de fuentes antropogénicas	≥6	Muy alto	>5	Extremadamente alto
		3≤CF<6	Considerable	4-5	Alto-extremadamente alto
		1≤CF<3	Moderado	3-4	Alto
<1	Sin fuentes antropogénicas	<1	Bajo	3-3	Moderado-alto
				1-2	Moderado
				0-1	No contaminado-moderado
				<0	No contaminado

Los indicadores EF, CF e I_{geo} fueron obtenidos para cada metal en cada punto, utilizando la concentración media calculada para los 4 muestreos. En las Tablas 4.27, 4.28 y 4.29 se muestran los valores de cada indicador para cada estación de muestreo y en la Figura 4.55 se representan los datos gráficamente para una mayor claridad.

Los valores del indicador EF son todos mayores que 1 (excepto en el caso del As en la estación de Palmones) indicando que existe influencia antropogénica en los sedimentos. Los valores más altos de EF se encuentran para Ni y Cr en Guadarranque, Palmones y Puente Mayorga, y para As en Isla Verde, indicando influencias industriales significativas procedente de la empresa Acerinox y la refinería Cepsa en el caso de Cr y Ni, y una influencia urbana y de tráfico marítimo en el caso del As. En el caso del Co, los valores de EF son próximos a 1 para todas las estaciones de muestreo, indicando una ligera presencia de fuentes antropogénicas.

Los valores de CF permiten clasificar los sedimentos de la siguiente forma:

- Considerablemente contaminados ($3 \leq CF < 6$): Cr en Palmones.
- Moderadamente contaminados ($1 \leq CF < 3$): As en Isla Verde, Ni en Palmones, Guadarranque y Puente Mayorga, Co en Guadarranque y Cr en todos los puntos de muestreo menos Playa de Getares.
- Con baja contaminación ($CF < 1$): el resto de los puntos de muestreo.

Los resultados de I_{geo} son menos restrictivos, caracterizando los sedimentos de la Bahía de Algeciras en su mayoría como no contaminados, excepto para el Cr en Palmones, donde existe un estado de contaminación moderado.

Estos indicadores de contaminación muestran que los sedimentos de la Bahía de Algeciras se encuentran todavía en un estado poco contaminado, excepto para los metales Ni y Cr en las estaciones próximas a zonas industriales.

Tabla 4.27. Valores de los indicadores EF para cada metal en las 5 estaciones de muestreo

Estación de muestreo	As	Ni	Co	Cr
Playa de Getares	2,19	1,15	1,08	1,69
Isla Verde	3,13	1,65	1,34	2,94
Palmones	0,77	2,90	1,33	4,91
Guadarranque	1,19	3,18	2,22	4,94
Puente Mayorga	1,72	2,87	1,27	4,01

Tabla 4.28. Valores de los indicadores CF para cada metal en las 5 estaciones de muestreo

Estación de muestreo	As	Ni	Co	Cr
Playa de Getares	0,84	0,44	0,42	0,65
Isla Verde	1,26	0,67	0,54	1,18
Palmones	0,55	2,08	0,95	3,52
Guadarranque	0,59	1,58	1,10	2,45
Puente Mayorga	0,83	1,39	0,61	1,94

Tabla 4.29. Valores de los indicadores I_{geo} para cada metal en las 5 estaciones de muestreo

Estación de muestreo	As	Ni	Co	Cr
Playa de Getares	-0,83	-1,76	-1,84	-1,20
Isla Verde	-0,25	-1,17	-1,47	-0,34
Palmones	-1,45	0,47	-0,65	1,23
Guadarranque	-1,35	0,07	-0,45	0,71
Puente Mayorga	-0,85	-0,11	-1,29	0,37

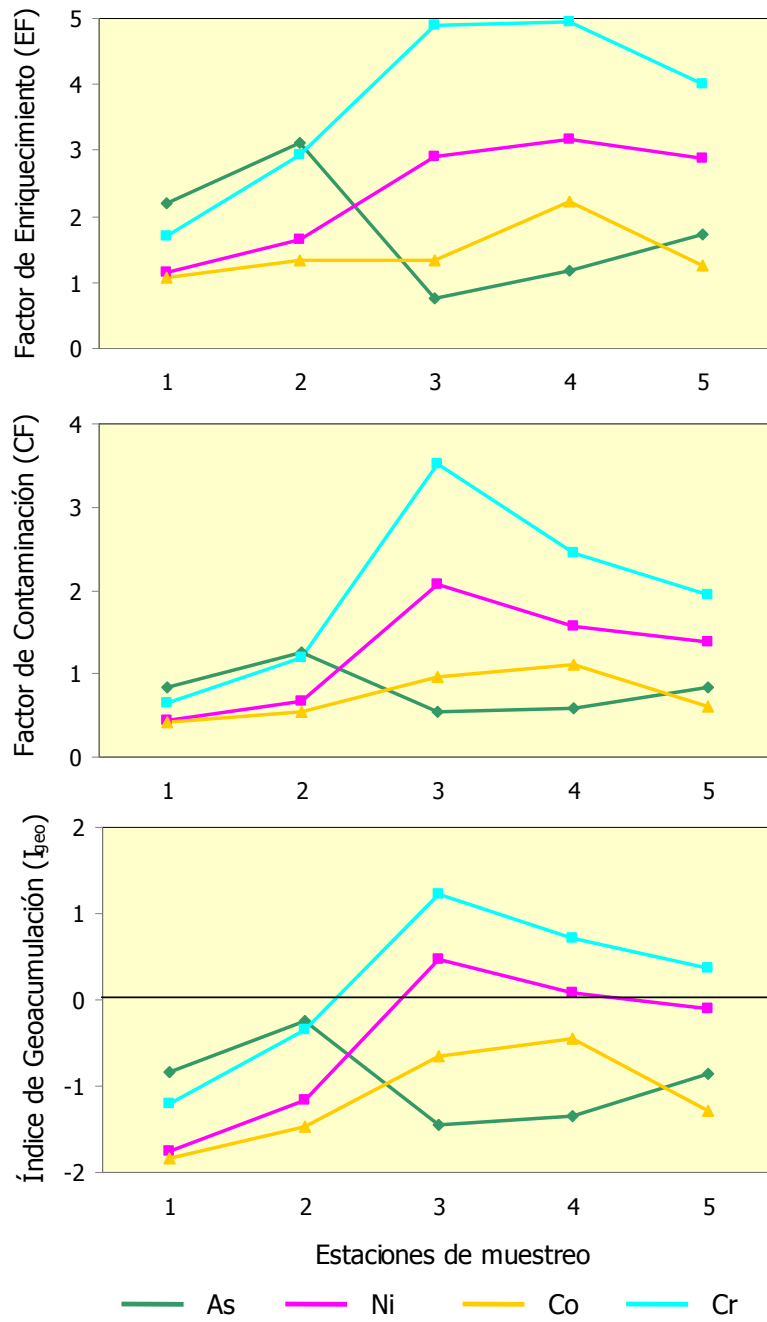


Figura 4.55. Indicadores de contaminación EF, CF e I_{geo} para As, Ni, Co y Cr en las 5 estaciones de muestreo

Una vez estudiados los niveles de As, Ni, Co y Cr en la columna de agua, en sedimentos y en peces, se procedió a estudiar el enriquecimiento de dichos metales en la biota a partir de sus cantidades presentes en las aguas.

Los estudios de bioacumulación de diferentes contaminantes pueden ayudar en la identificación de la biodisponibilidad de compuestos químicos en ecosistemas marinos [van Gestel y van Brummelen, 1996; Martín-Díaz y col., 2006]. Con el fin de estimar la capacidad de las especies para bioacumular los metales del medio en el que viven, y por tanto, la biodisponibilidad de éstos, se estudió el enriquecimiento de los metales en la biota por medio del factor de concentración (CF: concentration factor) y el ratio de enriquecimiento (ER: enhancement ratio), que no deben confundirse con los explicados anteriormente.

El factor de concentración [Fostner, 1976] o bioconcentración [DeForest y col., 2007] se define como la relación existente entre la concentración de un metal en un organismo y su concentración en cualquier compartimento del ecosistema donde se encuentre, como puede ser la fracción de metal total disuelto en agua de mar [Morel, 1983] o la fase intercambiable en los sedimentos [Luoma y Bryan, 1978]. Este factor se utiliza habitualmente para estimar la evolución de la contaminación a lo largo del tiempo y, tal y como propusieron Conti y colaboradores [Conti y col., 2002] es un indicador muy útil para comparar los niveles de contaminación entre sitios diferentes. Sin embargo, la comparación de la contaminación metálica mediante CF entre puntos de distintos ecosistemas (intercomparación) está afectada por el diseño del muestreo, la variabilidad espacio-temporal y las variables biológicas inherentes al organismo bajo estudio [Langston y Spence, 1995]. Como consecuencia, los estudios de bioacumulación demuestran que el vínculo entre CF y la contaminación real en las aguas es pobre si los sitios que se comparan tienen diferentes condiciones geoquímicas, hidrodinámicas y ambientales [Moriarty, 1999].

Por su parte, Muse y colaboradores demostraron que el factor (ratio) de enriquecimiento ER, definido como la relación entre la concentración de metal en el organismo y la concentración de metal disuelto lábil en agua, puede proporcionar un mejor significado medioambiental y superar las limitaciones que presenta el CF en la evaluación de la contaminación marina [Muse y col., 2006].

En este capítulo se han calculado ambos factores para cada metal, y se ha distinguido entre las especies bentónicas (lenguado) y las demersales (rascacio, rubio y sargo). En el caso del arsénico, el cálculo de ER se ha realizado utilizando los valores de concentración de dicho metal en la fracción disuelta inorgánica, que es la más tóxica y la que presenta un mayor riesgo para la biota. En el caso del Cr, los valores de concentración utilizados para calcular ER fueron los de cromo disuelto activo, por ser la más biodisponible. Para Ni y Co se utilizaron los valores de concentración de metal disuelto lábil. Los datos se detallan en la

Tabla A.11, del Anexo 5 y se muestran para mayor claridad en las Figuras 4.56, 4.57, 4.58 y 4.59.

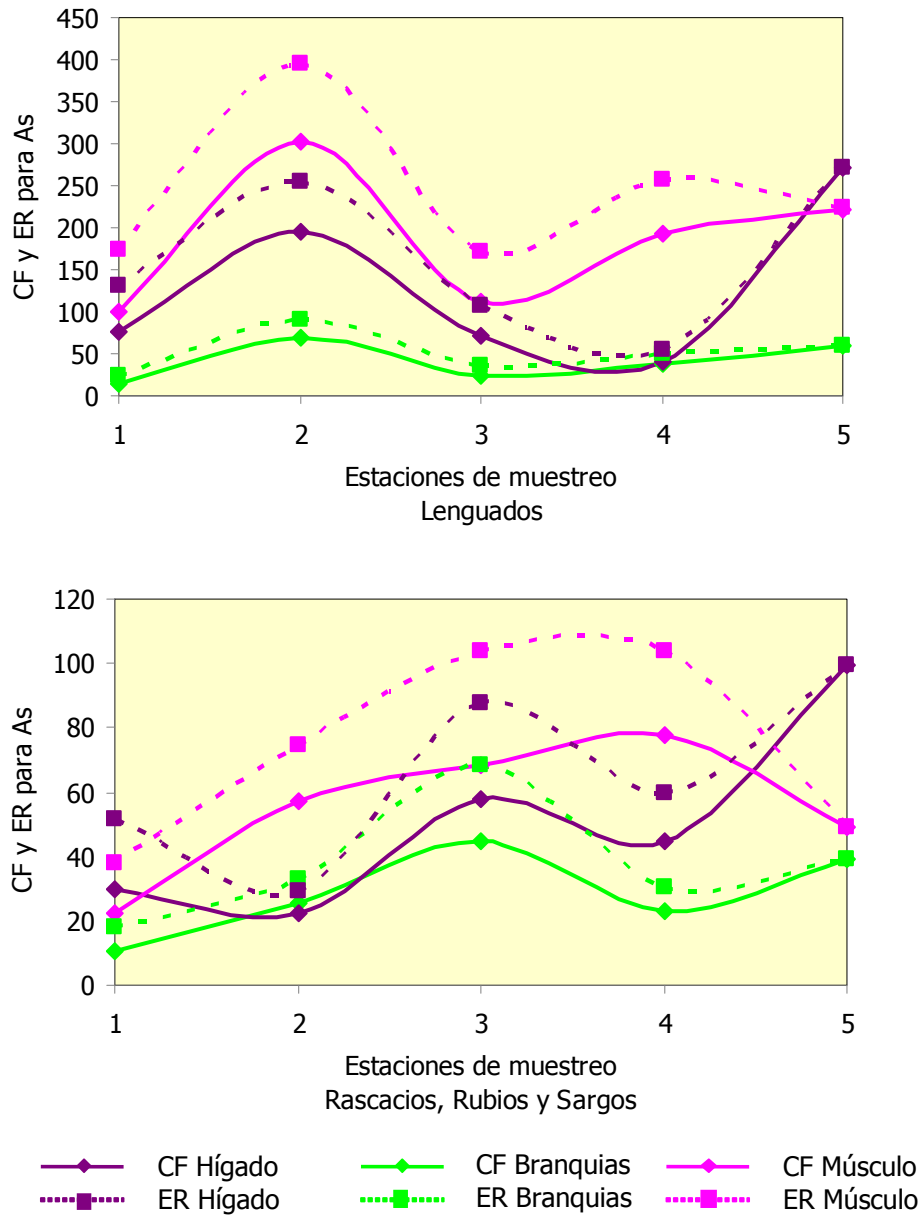


Figura 4.56. Factores de concentración y enriquecimiento (mg/kg de tejido/ μ g/L de agua) para As en lenguados, rascacios, rubios y sargos en las 5 estaciones de muestreo

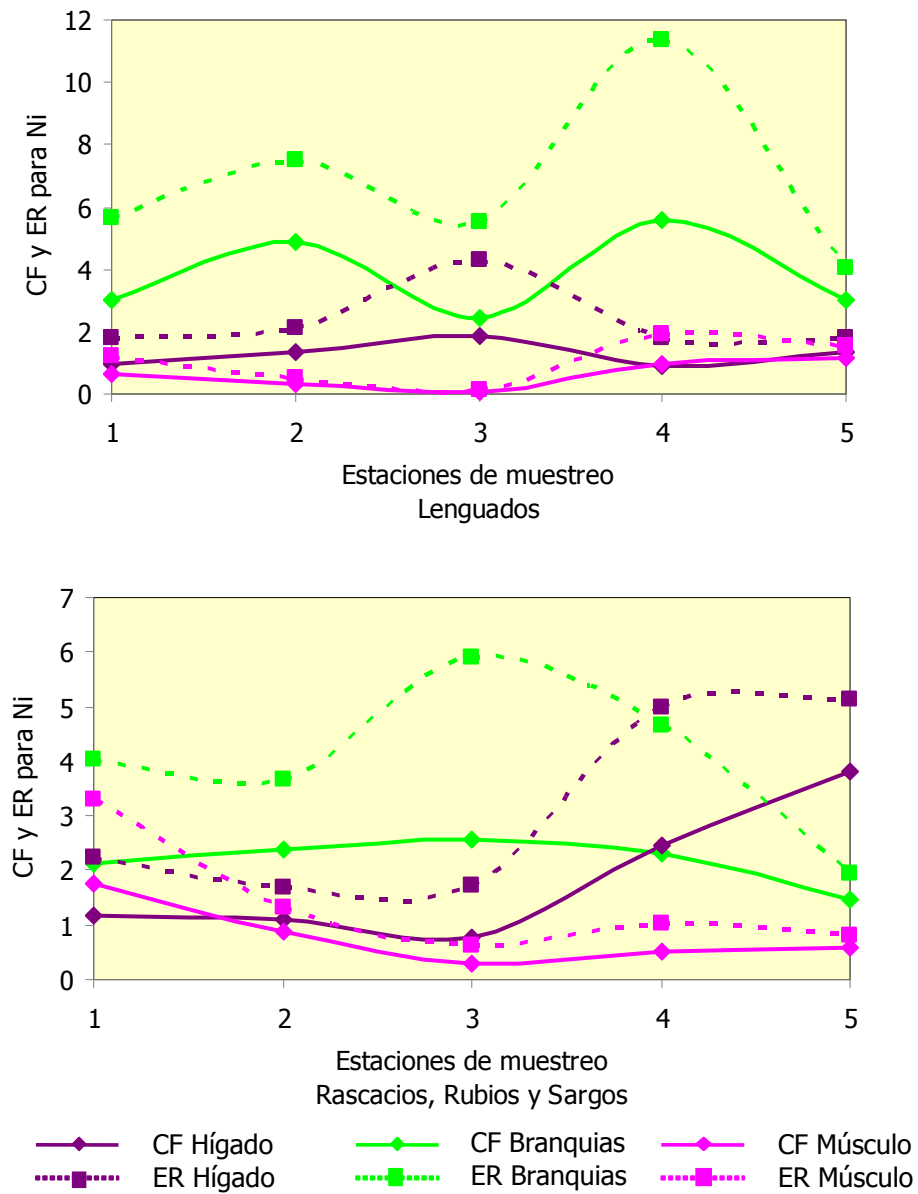


Figura 4.57. Factores de concentración y enriquecimiento (mg/kg de tejido/ $\mu\text{g/L}$ de agua) para Ni en lengados, rascacios, rubios y sargos en las 5 estaciones de muestreo

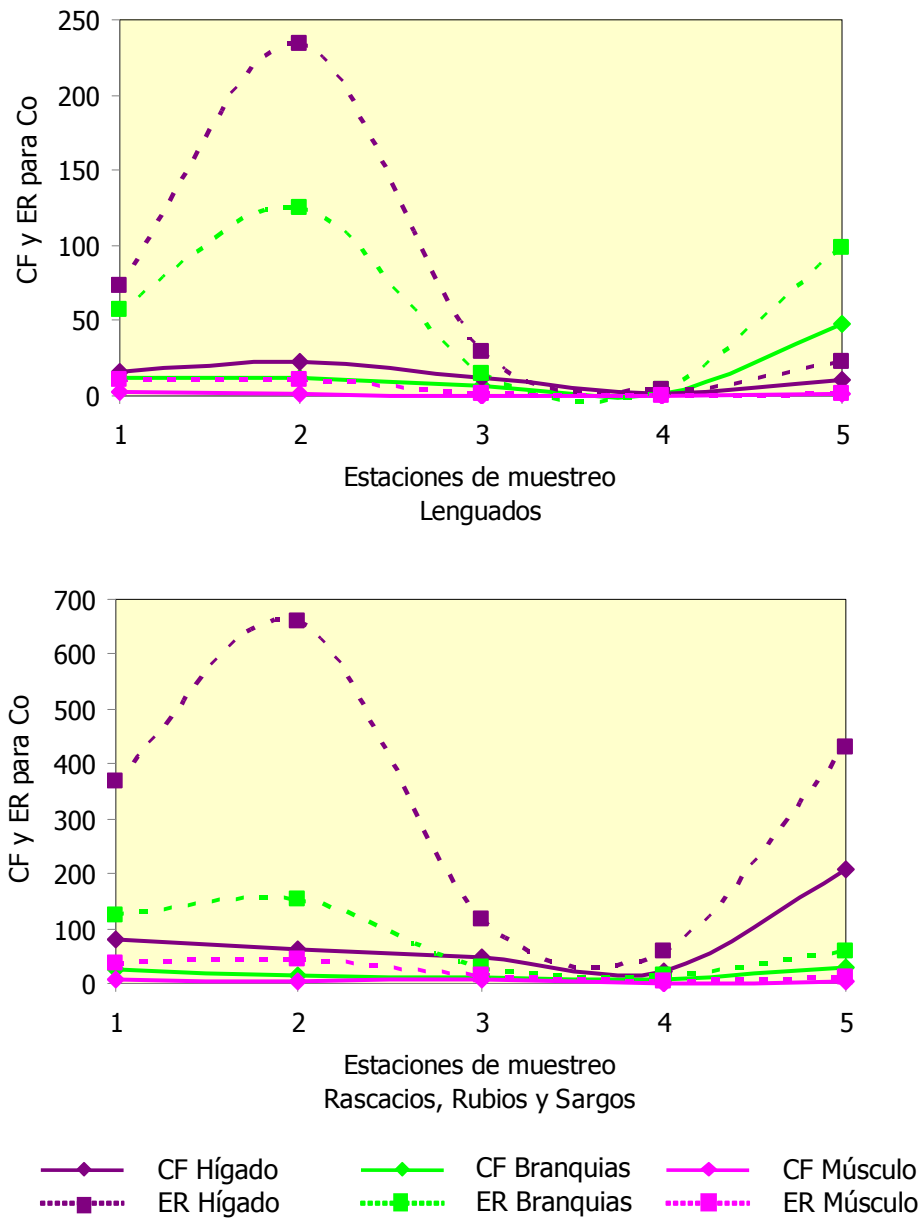


Figura 4.58. Factores de concentración y enriquecimiento (mg/kg de tejido/ $\mu\text{g/L}$ de agua) para Co en lenguados, rascacios, rubios y sargos en las 5 estaciones de muestreo

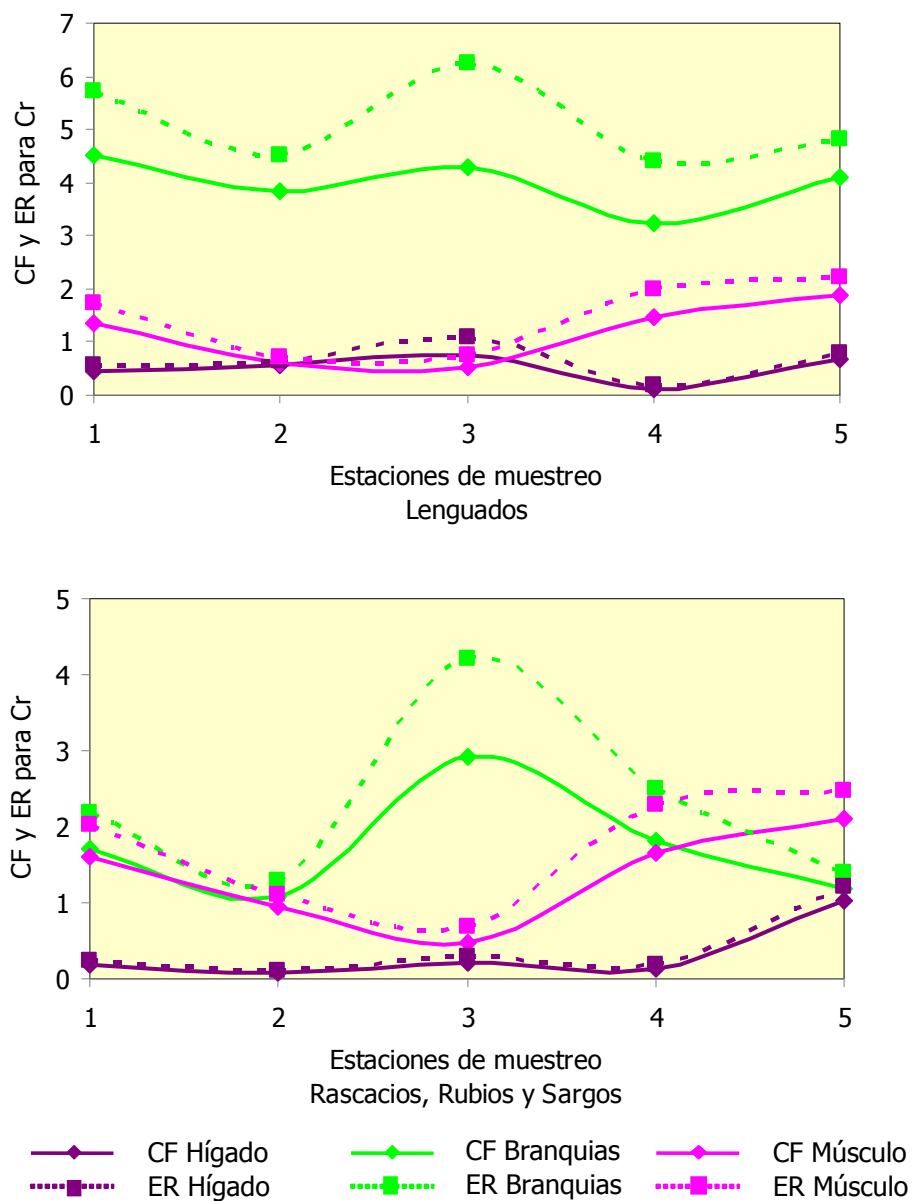


Figura 4.59. Factores de concentración y enriquecimiento (mg/kg de tejido/ $\mu\text{g/L}$ de agua) para Cr en lenguados, rascacios, rubios y sargos en las 5 estaciones de muestreo

Como primera observación, se deduce que ambos factores (CF y ER) presentan una parecida tendencia entre ellos. Sin embargo, tal y como era de esperar, el ratio de enriquecimiento es mayor puesto que se ha calculado con respecto a la fracción lábil de metal en las aguas, que es menor que la fracción total disuelta utilizada en el cálculo del factor de concentración.

A partir de los datos obtenidos para As, se puede concluir que se produce una mayor bioacumulación en lenguados que en rascacios, rubios y sargos. Las 4 especies de peces sufren una mayor concentración metálica en músculo y en hígado. La estación de muestreo donde los lenguados presentan una mayor acumulación de As es en Isla Verde y Puente Mayorga, puntos donde existe una mayor contaminación de As en aguas, peces y sedimentos. Sin embargo, para rascacios, rubios y sargos, existe una mayor bioacumulación en Palmones, Guadarranque y Puente Mayorga.

En el caso del Ni también se ha encontrado una mayor acumulación en lenguados que en el resto de las especies. Las branquias son los tejidos donde se acumula más el Ni, seguido del hígado. Los factores CF y ER son mayores en las estaciones de Isla Verde y Guadarranque para lenguados, y Palmones, Guadarranque y Puente Mayorga para rascacios, rubios y sargos.

Para el Co, exceptuando el ER en hígados de las especies demersales, los valores de ambos factores son mayores en lenguados. Se observa claramente una mayor acumulación en los peces de la estación de Isla Verde y Puente Mayorga.

Respecto al Cr, se observa que los valores de estos factores son mayores en lenguados, al igual que para el resto de los metales. Se puede observar claramente que se acumula principalmente en las branquias de lenguados, y en las branquias y músculos de rascacios, rubios y sargos. La estación que presenta mayores CF y ER es la de Palmones para hígado y branquias, y las de la Playa de Getares y Puente Mayorga para músculo.

El hecho de que en los lenguados se produzca una mayor acumulación de metal es esperable dado que este pez es una especie bentónica, cuyo hábitat está fuertemente ligada a los fondos marinos y los sedimentos, que, como se ha mencionado anteriormente, se comportan como sumideros de especies metálicas.

4.10.2. Comparación con valores de referencia

4.10.2.1. Comparación con valores de referencia en las muestras de agua

A continuación se realiza una comparación de los niveles metálicos obtenidos en este estudio con los valores de fondo, naturales y valores guías de concentración de metales en agua de mar disponibles en la bibliografía, con el objetivo de valorar el grado de contaminación de la Bahía de Cádiz (Tabla 4.30). La comparación no se realiza para la especiación metálica en agua debido a la ausencia de legislación y niveles guías que hagan referencia a estos valores, excepto para el caso del Cr, en donde se distingue entre Cr(III) y Cr(VI).

Tabla 4.30. Valores de fondo, naturales y valores guía de concentración de metales para agua de mar ($\mu\text{g/L}$)

Metal	Valores de fondo [Förstner y Wittman, 1983]	Concentración natural [Azcue, 1993]	Criterio NOAA-EPA de calidad de aguas [US EPA 2002] ^a		Objetivos de Calidad de las aguas (BOJA núm. 27 14/2/1997)	
			CMC ^b	CCC ^c	Clasificación de aguas litorales	Valores imperativos
As	2,1	1,3-2,5	69	36	Limitadas	50
					Normales	25
Ni	0,2	0,02-0,7	74	8,2	Limitadas	50
					Normales	25
Co	0,04	0,02	-	-	Limitadas	-
					Normales	-
Cr	0,08 ^d	0,09 ^d -0,55 ^d	10300 ^e	50 ^f	Limitadas	20 ^d /6 ^f
			1100 ^f		Normales	10 ^d /4 ^f

^a Referido a metal disuelto

^b CMC (criterio de máxima concentración): estimación de la máxima concentración de una sustancia en el agua a la cual pueda ser expuesta una comunidad acuática "puntualmente" sin que se produzca ningún efecto no recomendable.

^c CCC (criterio de concentración continua): estimación de la concentración máxima de una sustancia a la cual puede ser expuesta una comunidad acuática indefinidamente sin que produzca ningún efecto no recomendable.

^d Valores para Cr total

^e Valores para Cr(III)

^f Valores para Cr(VI)

En la Tabla 4.30 se recogen valores de fondo y concentraciones naturales de As, Ni, Co y Cr que han sido descritos para agua de mar. Igualmente, se recogen los niveles de referencia para evaluar el impacto sobre la vida acuática: las concentraciones CMC y CCC propuestas por NOAA referidas a metales disueltos, los cuales se definen como:

- *Concentraciones CMC (criterio de máxima concentración)*: se definen como la estimación de la máxima concentración de una sustancia en el agua a la cual pueda ser expuesta una comunidad acuática “puntualmente” sin que se produzca ningún efecto no recomendable.
- *Concentraciones CCC (criterio de concentración continua)*: se consideran aquellas que corresponden a la estimación de la concentración máxima de una sustancia a la cual puede ser expuesta una comunidad acuática indefinidamente sin que produzca ningún efecto no recomendable.

Por último, también se han incluido los valores imperativos legislados por la Junta de Andalucía (Orden de 14 de febrero de 1997, BOJA núm. 27, de 1997) para la calidad de las aguas litorales andaluzas, referidos al contenido metálico total en agua de mar. En esta orden se definen las aguas de la Bahía de Algeciras como aguas normales.

En las Figuras 4.60, 4.61, 4.62 y 4.63 se representan las concentraciones totales en agua para cada uno de los metales en los 4 muestreos, comparándolos con estos valores de referencia.

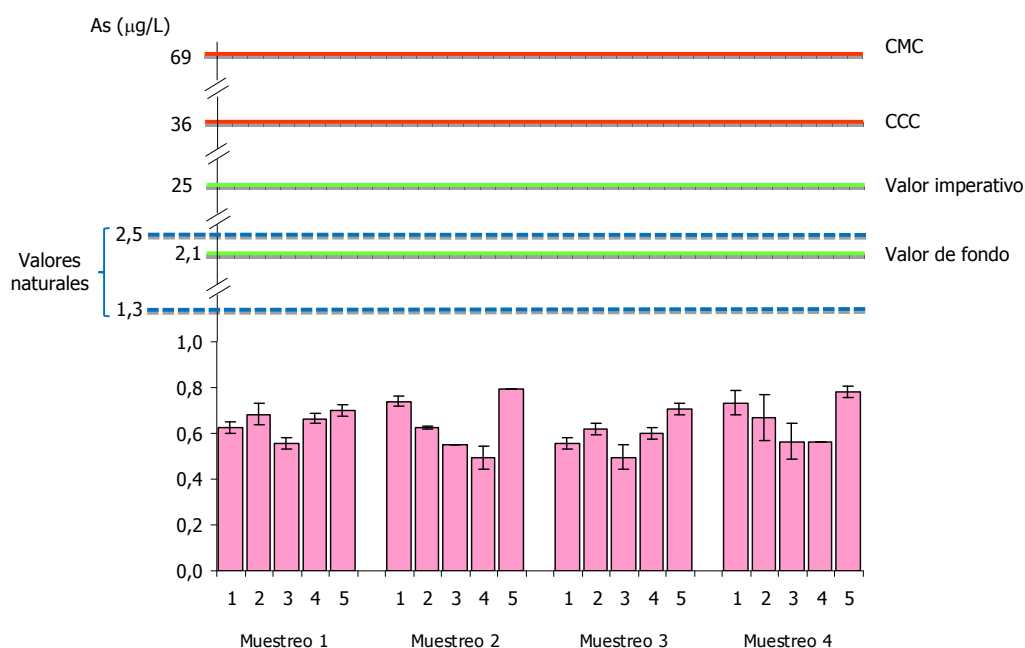


Figura 4.60. Comparación de las concentraciones totales de As (µg/L) en aguas con los niveles de referencia (CMC: criterio de máxima concentración; CCC: criterio de concentración continua)

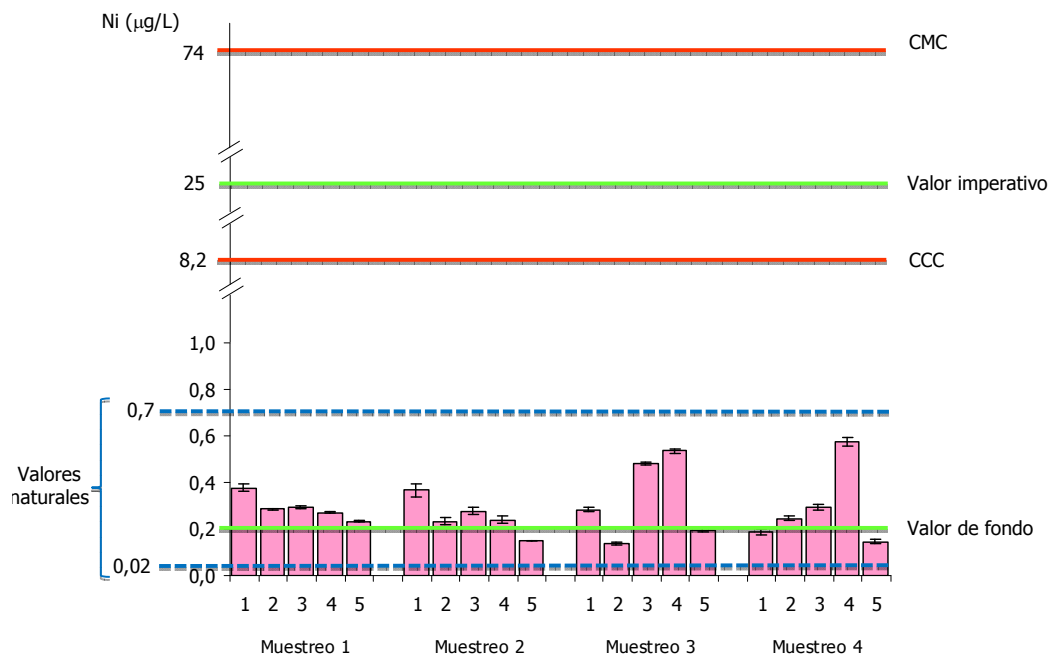


Figura 4.61. Comparación de las concentraciones totales de Ni ($\mu\text{g/L}$) en aguas con los niveles de referencia (CMC: criterio de máxima concentración; CCC: criterio de concentración continua)

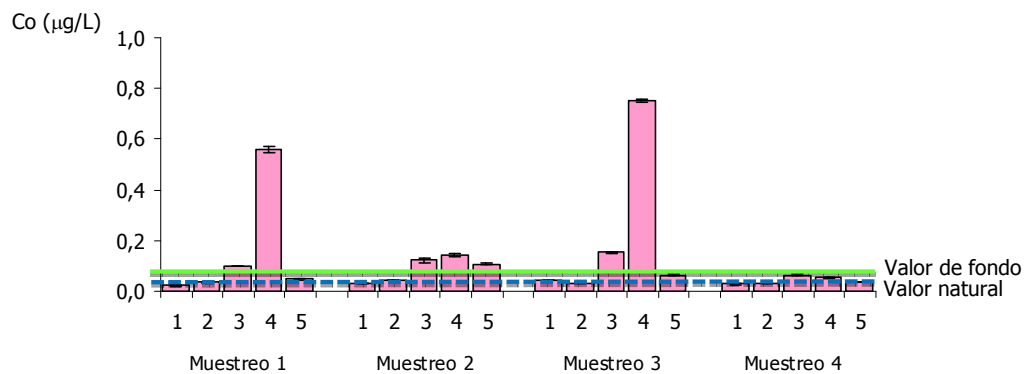


Figura 4.62. Comparación de las concentraciones totales de Co ($\mu\text{g/L}$) en aguas con los niveles de referencia (CMC: criterio de máxima concentración; CCC: criterio de concentración continua)

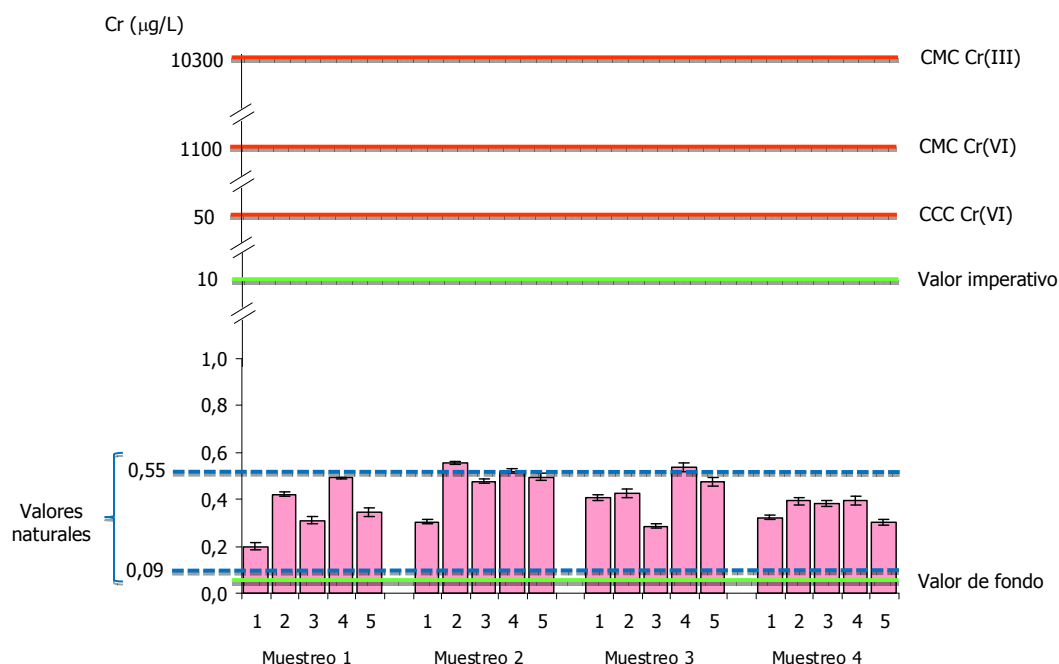


Figura 4.63. Comparación de las concentraciones totales de Cr (µg/L) en aguas con los niveles de referencia (CMC: criterio de máxima concentración; CCC: criterio de concentración continua)

La comparación de los datos con los de la Tabla 4.30 refleja que las concentraciones encontradas para As en aguas se encuentran dentro de los valores de fondo y naturales, por lo que a pesar de su disponibilidad, estudiada en el apartado anterior, los niveles no representan un carácter preocupante para este metal.

En relación a los valores de concentración de Cr y Ni, las concentraciones totales se sitúan por encima de los valores de fondo; pero se mantienen dentro del rango de las concentraciones naturales. No se sobrepasa en ningún muestreo los valores descritos de CMC y CCC, ni los valores imperativos establecidos por la Junta de Andalucía para las aguas clasificadas como normales.

Por último, para el caso de Co, la estación de Guadarranque en otoño de 2007 y 2008 presenta unos valores mucho más altos que las concentraciones naturales observadas en agua de mar, aunque no se disponen de niveles guía para este metal por lo que no se pueden evaluar los posibles efectos que tienen sobre la vida acuática.

En general, se puede concluir que si bien la disponibilidad de los metales estudiados en estas aguas es alta, los niveles de metales disueltos no parecen indicar un riesgo para la vida de este ecosistema. Al parecer, la renovación de estas aguas debido a las posibles corrientes y la tendencia de estos metales a pasar al sedimento (sobre todo para As, Ni y Cr) pueden contribuir a ello.

4.10.2.2. Comparación con valores de referencia en las muestras de sedimentos

En el caso de las muestras de sedimentos, se han comparado los datos de contenido total con los valores medios en sedimentos, utilizándose como referencia de éstos las concentraciones medias calculadas por Turekian y Wedepohl para esquistos (rocas sedimentarias) [Turekian y Wedepohl, 1961], valores que constituyen una de las referencias más utilizadas puesto que fueron elegidas para definir los indicadores de contaminación de sedimentos. También se han comparado con los niveles guía para la protección de la vida acuática descritos en la bibliografía. La comparación no se realiza para la especiación metálica debido a la ausencia de legislación y niveles guías que hagan referencia a estos valores.

En la Tabla 4.31 se recogen valores medios y concentraciones naturales que han sido descritos para sedimentos. Igualmente, se recogen los niveles guía para la protección de la vida acuática (ISQG y PEL) y los niveles NS&T con efectos biológicos (ERL y ERM). Estos datos están descritos para contenidos totales y no para las distintas fases de la especiación.

Tabla 4.31. Valores medios y niveles guía de calidad para las concentraciones metálicas en sedimentos (mg/kg)

Metal	Valores medios de roca sedimentaria continental [Turekian y Wedepohl, 1961]	Niveles guía para la protección de la vida acuática: sedimentos marinos [Canadian Sediment Quality Guidelines, 2002]		Niveles NS&T con efectos biológicos [Buchman, 2008]	
		ISQG	PEL	ERL	ERM
As	13	7,24	41,6	8,2	70
Ni	68	15,9	42,8	20,9	51,6
Co	19	-	-	NT ^a	NT ^a
Cr	90	52,3	160	81	370

^aNT: estos elementos no son tóxicos incluso a altas concentraciones

Las definiciones de estos niveles son las siguientes:

ISQG (*Interim Sediment Quality Guidelines*): Valor guía de calidad del sedimento.

PEL (*Probable Effect Level*): Nivel con efectos probables sobre la vida acuática.

ERL (*Effects Range Low*): Concentración con efectos biológicos bajos. Por debajo de este nivel, el sedimento no se considera tóxico puesto que solo presentan efectos adversos menos del 10% de los organismos estudiados.

ERM (*Effects Range Medium*): Concentración con efectos biológicos considerables. Por encima de este nivel, el sedimento se considera tóxico, puesto que más del 75% de organismos estudiados presentan efectos adversos.

En las Figuras 4.64, 4.65, 4.66 y 4.67 se representan las concentraciones totales en sedimentos para cada uno de los metales en los 4 muestreos, comparándolos con estos valores de referencia.

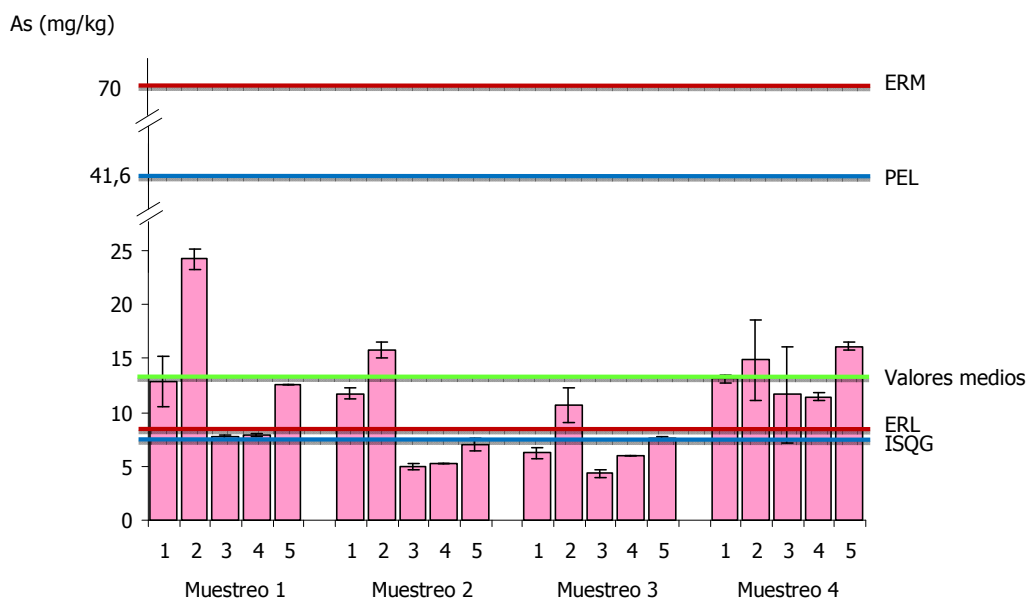


Figura 4.64. Comparación de las concentraciones totales de As (mg/kg) en sedimentos con los niveles de referencia (ISQG: Valor guía de calidad del sedimento, PEL: Nivel con efectos probables sobre la vida acuática, ERL: Concentración con efectos biológicos bajos, ERM: Concentración con efectos biológicos considerables)

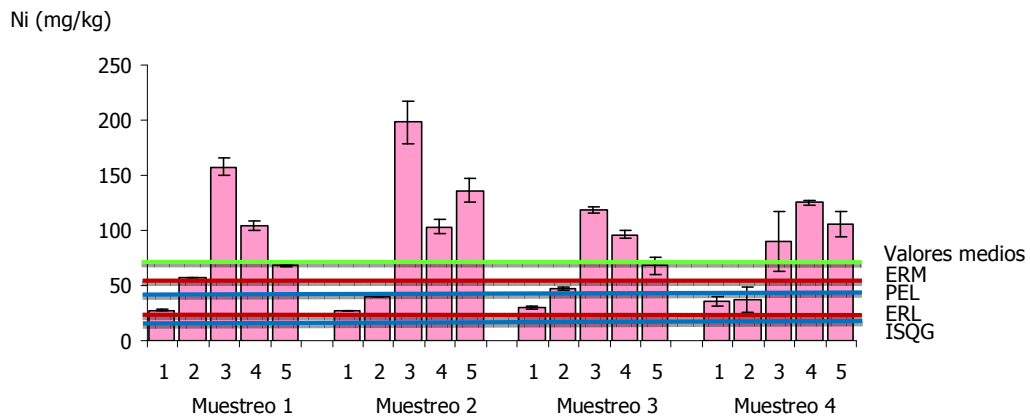


Figura 4.65. Comparación de las concentraciones totales de Ni (mg/kg) en sedimentos con los niveles de referencia (ISQG: Valor guía de calidad del sedimento, PEL: Nivel con efectos probables sobre la vida acuática, ERL: Concentración con efectos biológicos bajos, ERM: Concentración con efectos biológicos considerables)

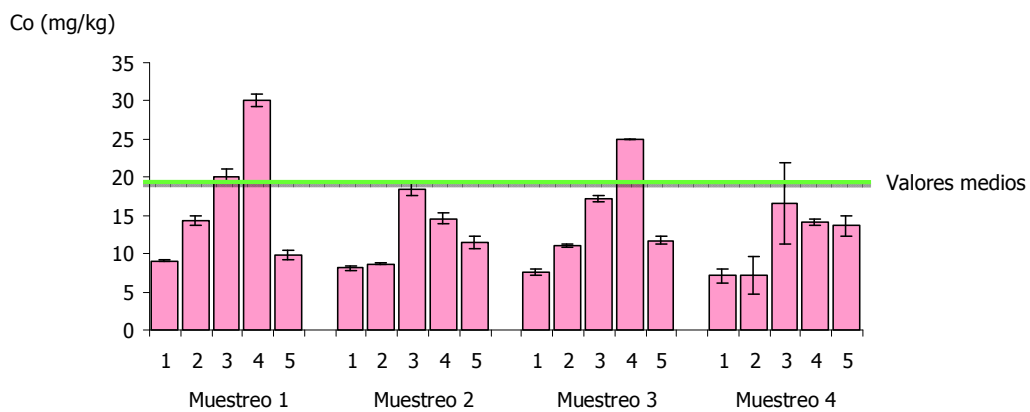


Figura 4.66. Comparación de las concentraciones totales de Co (mg/kg) en sedimentos con los niveles de referencia (ISQG: Valor guía de calidad del sedimento, PEL: Nivel con efectos probables sobre la vida acuática, ERL: Concentración con efectos biológicos bajos, ERM: Concentración con efectos biológicos considerables)

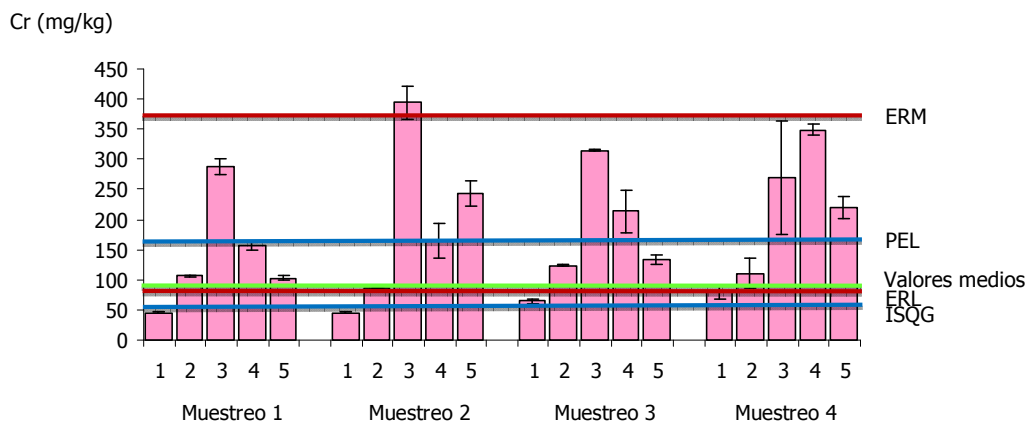


Figura 4.67. Comparación de las concentraciones totales de Cr (mg/kg) en sedimentos con los niveles de referencia (ISQG: Valor guía de calidad del sedimento, PEL: Nivel con efectos probables sobre la vida acuática, ERL: Concentración con efectos biológicos bajos, ERM: Concentración con efectos biológicos considerables)

La comparación de los datos de Co con los datos de la Tabla 4.31 sitúa los niveles de este metal en los sedimentos de la Bahía de Algeciras dentro de los valores medios y naturales descritos, excepto en la estación de Palmones durante el muestreo 1 y la de Guadarranque en los muestreos 1 y 3, donde la concentración obtenida de Co supera ligeramente el valor medio de roca sedimentaria continental.

Sin embargo, los metales As, Ni y Cr superan algunos de los niveles guía de calidad de sedimentos: en el caso del As, se superan los niveles ISQG y ERL en la mayoría de los puntos de muestreo. En el caso del Ni, se superan los niveles de ISQG y ERL en las 5 estaciones durante todos los muestreos. Por su parte, los valores de ERM y PEL son superados en las estaciones de Palmones, Guadarranque y Puente Mayorga en los cuatro muestreos, así como en la estación de Isla Verde en el muestreo de otoño de 2007. El PEL también se supera en Isla Verde en el muestreo de otoño de 2008. En el caso del Cr, se superan los valores ISQG y ERL en todas las estaciones durante los 4 muestreos (excepto en la estación de Playa de Getares). El nivel PEL es superado en las estaciones de Palmones y Guadarranque en todos los muestreos, y en Puente Mayorga en los muestreos de primavera 2008 y 2009. El nivel ERM se supera únicamente en la estación de Palmones en el muestreo realizado en la primavera de 2008.

Por tanto, puede decirse que As, Ni y Cr pueden presentar problemas de toxicidad debido a sus niveles en los sedimentos. En el caso del As, la disponibilidad era mayor en Palmones, Guadarranque y Puente Mayorga, por lo que habrá que tener en cuenta ambos

resultados (toxicidad del contenido total y porcentaje de metal más disponible). Hay que destacar que para Ni, en el punto de Palmones, donde se sobrepasaron los niveles recomendados de toxicidad, el metal se encontraba de forma disponible, lo que lo hacía potencialmente tóxico. Y por último, para el Cr, si bien supera los niveles de toxicidad recomendados en cuanto a contenido total, hay que destacar que era poco disponible.

De todo ello se deduce que en los sedimentos analizados se pueden considerar como tóxicos y disponibles los metales As, Cr y Ni, fundamentalmente en el punto de Palmones y, en menor medida, en Guadarranque.

Por otro lado, Choueri y col. desarrollaron en 2009 nuevos niveles guías de calidad de sedimentos específicos para el Golfo de Cádiz, que resultan más restrictivos que los nacionales e incluso los internacionales [Choueri y col., 2009]. Estos niveles se calcularon utilizando una serie de datos físico-químicos, toxicológicos y de estructuras de comunidades bentónicas. Así, generaron datos para Cd, Co, Cu, Ni, Pb, V y Zn. En la Tabla 4.32 se muestran los niveles de calidad para el Ni y el Co, que son dos de los metales estudiados en esta tesis. Según estos autores, las concentraciones por debajo del nivel de calidad inferior se consideran no perjudiciales para la biota acuática. Por ello, los sedimentos que contengan niveles menores se consideran como no contaminados. Por otra parte, las concentraciones por encima del nivel máximo son potencialmente tóxicas para el ecosistema, considerándose los sedimentos como altamente contaminados. Por último, en el rango de concentraciones situado entre los dos límites, no son predecibles respuestas biológicas, por lo que los sedimentos que contengan estas cantidades se consideran moderadamente contaminados.

Tabla 4.32. Niveles guía de calidad para metales en el Golfo de Cádiz (mg/kg de peso seco) [Choueri y col., 2009]

Metal	Niveles guía de sedimentos		
	No contaminado	Moderadamente contaminado	Altamente contaminado
Ni	≤8,9	8,9-42,3	≥42,3
Co	≤6,8	6,8-14,0	≥14,0

Comparando los resultados encontrados en los sedimentos de la Bahía de Algeciras con los citados niveles guías, se llega a las siguientes conclusiones: Los sedimentos en los puntos de muestreo de Palmones, Guadarranque y Puente Mayorga durante todos los muestreos, así como Isla Verde en los tres primeros, superan el valor de 42,3 mg/kg para Ni, considerándose éstos como sedimentos altamente contaminados. Los sedimentos recogidos en los restantes puntos de muestreo (Getares durante todos los muestreos e Isla

Verde durante el último muestreo) manifiestan un carácter moderadamente contaminado. En cuanto al Co, los puntos de Palmones y Guadarranque en todos los muestreos, así como Isla Verde en el primero, superan el valor de 14 mg/kg, por lo que se consideran sedimentos altamente contaminados. Los puntos restantes (Getares y Puente Mayorga en todos los muestreos e Isla Verde en los tres últimos) muestran sedimentos moderadamente contaminados.

4.10.2.3. Comparación con valores de referencia en las muestras de peces

Según el Convenio sobre la protección del medio marino del Noroeste Atlántico (OSPAR) [OSPAR, 2009] no se han podido calcular valores de fondo para metales en peces dada la limitada cantidad de datos que se tienen. Tampoco se han encontrado en la bibliografía niveles máximos permitidos o niveles guías en tejidos de peces, sino solamente en la criatura completa. Así, por ejemplo, el máximo permitido de As, según estándares de Singapur, Malasia y Australia es 1 mg/kg de peso húmedo [Muñoz y col., 2000]; mientras que el máximo permitido de Cr, según la legislación brasileña es de 0,1 mg/kg de peso húmedo [Tarley y col., 2001]. Por todo ello, no se pueden comparar los valores obtenidos en nuestro estudio con niveles guía de calidad, aunque han sido previamente comparados con resultados obtenidos en otros ecosistemas acuáticos.

4.11. Conclusiones

La contaminación metálica (As, Ni, Co y Cr) en las aguas, peces y sedimentos de la Bahía de Algeciras ha sido evaluada en este trabajo. Las concentraciones de metal encontradas en agua fueron mayores para el As, seguido del Cr, Ni y Co. En los sedimentos, las concentraciones pueden ordenarse como: $Cr > Ni > Co > As$. Estas concentraciones fueron comparadas con valores de fondo y niveles guía, encontrándose que dichos valores no eran superados para ningún metal en el caso de las aguas; por el contrario, sí lo fueron de manera severa para el Cr y el Ni en los sedimentos. Además, se realizó el estudio de especiación tanto en aguas como en sedimentos, obteniendo información de la biodisponibilidad de cada metal. De manera general, el Ni y el Cr fueron los más disponibles en aguas, mientras que en sedimentos lo fueron el As y el Co.

El efecto de esta contaminación fue estudiado mediante la evaluación de la acumulación de dichos metales en 4 especies de peces (lenguado, rascacio, rubio y sargo). Para ello, se analizaron las concentraciones de As, Co, Ni y Cr en hígado, branquias y músculo. El contenido metálico en peces puede ser ordenado de la siguiente manera: $As \gg Co > Ni \geq Cr$. Se encontraron altas concentraciones de As y Co principalmente en

hígados, mientras que el Ni y Cr se acumularon más en branquias. Los lenguados se vieron más afectados por la contaminación metálica que las demás especies.

Aunque las muestras de agua no superaban los límites permitidos, se ha demostrado que la contaminación producida por actividades industriales, los desechos urbanos de la ciudad de Algeciras y las actividades marítimas del Puerto de Algeciras están afectando a los sedimentos y peces de este ecosistema. Según los índices de contaminación existe una contaminación moderada de As, Ni y Cr en la Bahía de Algeciras, que tendrá que tenerse en cuenta en un futuro para proponer medidas de remediación.

Conclusiones generales

Teniendo en cuenta todos los resultados que se han obtenido de la investigación llevada a cabo en esta Tesis, se pueden enumerar como principales conclusiones las que se muestran a continuación:

1. Se ha desarrollado una nueva metodología de preconcentración de trazas de Cu(II) mediante extracción en fase sólida, utilizando discos SDB previamente modificados con el ligando orgánico quelatante *Saliciloilhidrazona del Piridoxal* (PSH). Para el estudio de las condiciones óptimas de este nuevo método se ha realizado una estrategia estadística en dos etapas: optimización univariante y diseño de experimentos factorial fraccionario. El nuevo método presenta un buen límite de detección y un amplio rango lineal de trabajo, así como aplicabilidad a muestras de agua con matriz salina, ya sea de agua de mar o de estuario.
2. Se ha evaluado la aplicabilidad de las técnicas AGNES (Redisolución en Ausencia de Gradiente y en Equilibrio Nernstiano) y SSCP (Cronopotenciometría de Redisolución de Barrido) para el estudio respectivo de la concentración de Pb(II) libre y su especiación, en muestras de agua de mar sintética y real. Se ha encontrado que los resultados de AGNES concuerdan perfectamente con los datos calculados a partir de MINTEQ. Además,

se ha confirmado que la metodología de cálculo utilizada en SSCP para determinar la concentración de metal libre es válida para muestras en ausencia de ligandos heterogéneos. En este tipo de sistemas complejos, SSCP es capaz de establecer la presencia de ligandos heterogéneos mientras que AGNES mide, sin errores, la concentración de metal libre en el seno de la disolución. Por ello, el uso simultáneo de ambos métodos tiene grandes ventajas debido a la información complementaria que facilitan.

3. Por último, también se ha realizado un estudio integrado de impacto medioambiental en la Bahía de Algeciras, zona afectada por una intensa actividad antropogénica. Para ello, se han evaluado los niveles metálicos totales y su especiación química, en muestras de agua, sedimento y peces tomados en 5 puntos de la bahía. Los estudios realizados pueden resumirse de la siguiente manera:

- Se han establecido los niveles totales de metales (As, Cr, Ni y Co, metales muy significativos de la industria siderúrgica y petroquímica) presentes en las aguas y los sedimentos, así como su distribución en las distintas fracciones químicas (especiación) en ambos compartimentos medioambientales. Los resultados muestran que el As presenta un contenido total en agua mayor que el resto de los metales, mientras que en los sedimentos, el metal mayoritario era el Cr. En algunas muestras de sedimentos los niveles guía de calidad fueron superados. Con respecto a la especiación, se ha encontrado que el Ni y el Cr son los más biodisponibles en las aguas, mientras que en los sedimentos lo fueron el As y el Co.
- Asimismo, se han cuantificado los niveles de concentración de metales en tejidos de hígado, músculo y branquias en peces de interés comercial para estudiar el efecto que la contaminación química ejerce sobre estas especies. Los peces estudiados fueron lenguados, rascacios, rubios y sargos. Se ha llegado a la conclusión de que los peces presentan altas concentraciones de As, seguido de Co, que se acumulan principalmente en hígados, mientras que el Ni y el Cr se acumularon más en branquias. La especie más afectada por la contaminación metálica es el lenguado.
- Para una valoración global del estado de contaminación presente en la Bahía de Algeciras, se han calculado índices de contaminación metálica, según los cuales, las zonas de Palmones y Guadarranque son las que presentan mayor contaminación metálica, tanto para aguas como para sedimentos y peces. Además, se han calculado índices de contaminación específicos para sedimentos, los cuales muestran que la bahía está, en general, moderadamente contaminada de As, Ni y Cr.

- Además, se han correlacionado los niveles metálicos en el medio biótico con el medio abiótico, identificando las formas químicas más biodisponibles, y en consecuencia con mayor potencial tóxico, para los metales estudiados.

Puede concluirse que la investigación llevada a cabo en esta Tesis ha dado lugar al desarrollo de un nuevo método de análisis de Cu(II) en aguas naturales mediante extracción en fase sólida, así como la nueva aplicabilidad de las técnicas AGNES y SSCP al estudio de Pb(II) en agua de mar. Asimismo, se ha realizado un estudio desde el punto de vista de la investigación aplicada que consiste en la evaluación de la contaminación ambiental en la Bahía de Algeciras para conocer el estado de sus aguas, sedimentos y peces.

Anexos

Anexo 1. Preparación de disoluciones y reactivos

En todos los capítulos se hizo uso de disoluciones de metales de diferentes concentraciones. Además, en el Capítulo 2 se utilizaron disoluciones reguladoras de acético/acetato a pH 3,5; 4; 4,5; 5 y 5,5. En el Capítulo 3, se usaron dos disoluciones reguladoras (MES y MOPS) y varias disoluciones acuosas de NaNO_3 de diferentes concentraciones. En el Capítulo 4, se hizo uso de la disolución reguladora cloruro amónico/amoniaco a pH 9,5, así como varias disoluciones durante la realización del procedimiento de especiación metálica con DTPA y BCR en sedimentos. A continuación se detalla la preparación específica de cada una de estas disoluciones:

Disoluciones de metales: Las disoluciones de los metales utilizados fueron preparadas por dilución de patrones de 1000 mg/L (Merck, Alemania) enrasando con agua desionizada Milli-Q. A todas las disoluciones de metal se les añade HNO_3 para su conservación, en una relación de 50 μL de HNO_3 concentrado Suprapur por cada 25 mL de disolución. La disolución de Cr de 1000 mg/L se preparó disolviendo 0,283 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (Merck, Alemania) en agua Milli-Q y enrasando hasta 100 mL. Las disoluciones patrón de As se prepararon disolviendo (As_2O_3) en HCl al 30% de calidad Suprapur (Merck, Alemania) en 10% de volumen final, neutralizando con una disolución de NaOH 1 mol/L hasta pH 7,00.

Disolución reguladora acético/acetato a pH 4,5, con una concentración de 4 mol/L (AcH/AcNa): se pesan 240 g de ácido acético glacial 100% de calidad Suprapur (Merck, Alemania) y se añade una cantidad suficiente de hidróxido sódico de calidad para análisis (Merck, Alemania) hasta que el pH sea el adecuado. Finalmente se enrasa con agua desionizada Milli-Q (Millipore) en un matraz aforado de 1 L. Para las restantes disoluciones reguladoras de esta naturaleza, se ajustó su pH utilizando cantidades apropiadas de NaOH.

Disolución reguladora ácido 2-morfolino etano sulfónico (MES) a pH 6 con una concentración de 0,2 mol/L: se pesan 2,133 g de MES (Fluka, Microselect, >99.5%) y se

añade una cantidad suficiente de agua para disolverlo. Luego se añade NaOH 1 mol/L de calidad para análisis (Riedel-de Haën) hasta que el pH suba a 6. Finalmente se enrasa con agua desionizada Milli-Q (Millipore) en un matraz aforado de 50 mL.

Disolución reguladora ácido 3-morfolino propano sulfónico (MOPS) a pH 7 con una concentración de 0,2 mol/L: se pesan 2,093 g de MOPS (Fluka, Microselect, >99.5%) y se añade una cantidad suficiente de agua para disolverlo. Luego se añade NaOH 1 mol/L de calidad para análisis (Riedel-de Haën) hasta que el pH suba a 7. Finalmente se enrasa con agua desionizada Milli-Q (Millipore) en un matraz aforado de 50 mL.

Disolución acuosa de nitrato sódico (NaNO_3) con una concentración de 0,01 mol/L: se pesan 0,425 g de NaNO_3 de calidad para análisis (Merck, Alemania) y se disuelven enrasando con agua desionizada Milli-Q en un matraz aforado de 500 mL.

Disolución acuosa de NaNO_3 con una concentración de 0,1 mol/L: se pesan 4,25 g de NaNO_3 de calidad para análisis (Merck, Alemania) y se disuelven enrasando con agua desionizada Milli-Q en un matraz aforado de 500 mL.

Disolución acuosa de NaNO_3 con una concentración de 0,55 mol/L: se pesan 23,357 g de NaNO_3 de calidad para análisis (Merck, Alemania) y se disuelven enrasando con agua desionizada Milli-Q en un matraz aforado de 500 mL.

Disolución reguladora cloruro amónico/amoniaco a pH 9,5, con una concentración de 6 mol/L ($\text{NH}_4\text{Cl}/\text{NH}_3$): se añade un volumen de 45 mL de amoniaco 25% de calidad Suprapur (Merck, Alemania) a 21 mL de ácido clorhídrico 30% de la misma calidad y se enrasa con agua Milli-Q (Millipore) en un matraz aforado de 100 mL.

Disolución de dimetilgioxima (DMG) 0,05 mol/L: se pesaron 0,058 g de dimetilgrioxima de calidad para análisis (Merck, Almenia) y se disolvieron con etanol enrasando a 10 mL.

Disolución de DTPA 0,05 mol/L + acetato de sodio 0,2 mol/L + nitrato de sodio 2,5 mol/L: se pesan 1,96 g de DTPA de calidad para análisis (Merck, Alemania), 1,64 g de nitrato de sodio de calidad Suprapur (Merck, Alemania) y 21,3 g de nitrato de sodio de calidad Suprapur (Merck, Alemania) y se disuelven enrasando hasta un volumen de 100 mL.

Disolución de DTPA 0,005 mol/L + CaCl_2 0,01 mol/L + TEA 0,1 mol/L: se pesan 1,967 g de DTPA, 1,47 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 14,92 g de TEA, y se disuelven en 900 mL de agua Milli-Q, se ajusta el pH a 7,3 utilizando HCl 1 mol/L de calidad Suprapur, Merck (Alemania) y se enrasó hasta 1 L.

Disolución de ácido clorhídrico 3,86 mol/L: Se tomaron 320 mL de ácido clorhídrico fumante 37% de calidad para análisis (Merck, Alemania) y se enrasó hasta 1 L con agua desionizada (Milli-Q).

Disolución de ácido acético 0,11 mol/L: Se tomaron 6,25 mL de ácido y se enrasaron hasta 1 L con agua desionizada (Milli-Q).

Disolución de cloruro de hidroxilamonio 0,5 mol/L ajustado a pH 1,5: Se disolvieron 34,75 g de cloruro de hidroxilamonio en 500 mL de agua desionizada Milli-Q, se ajusta el pH a 1,5, utilizando HNO₃ al 65% de calidad Suprapur, Merck (Alemania) y se enrasó hasta 1 L con agua desionizada (Milli-Q).

Disolución de acetato amónico 1 mol/L ajustado a pH 2: se disuelven 77 g de acetato amónico de calidad para análisis, en 500 mL de agua desionizada Milli-Q, se ajusta el pH a 2, utilizando HNO₃ al 65% de calidad Suprapur, Merck (Alemania) y se enrasó hasta 1 L con agua desionizada (Milli-Q).

Anexo 2. Datos de los estudios previos en los 17 puntos de muestreo

Anexo 2.1. Datos de concentración de metal total en las muestras de sedimento

Tabla A.1. Concentración de metal total en sedimentos (mg/kg)

Puntos	As (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Co (mg/kg)	Cr (mg/kg)
1.1	11,395±1,100	18,816±1,219	6,038±0,478	30,207±1,563
2.1	22,735±1,839	26,833±1,422	9,826±0,396	50,841±1,538
2.2	17,379±0,781	36,341±2,331	10,075±0,281	68,257±2,696
3.1	9,151±0,737	55,022±1,324	9,087±0,328	93,282±1,802
3.2	21,257±1,324	56,906±2,745	14,898±0,304	92,586±1,931
4.1	8,769±0,756	57,291±1,331	9,659±0,407	91,763±1,809
4.2	9,699±1,054	61,536±2,636	11,088±0,487	97,912±2,900
5.1	7,870±0,922	80,929±2,225	13,087±0,400	142,844±3,284
5.2	7,640±0,883	77,675±4,476	12,714±0,408	139,124±5,062
6.1	8,214±1,240	143,900±4,263	15,799±0,596	250,892±2,247
6.2	11,944±0,860	141,478±0,818	16,097±0,412	238,298±2,578
7.1	8,002±1,082	88,586±3,157	21,646±0,702	172,283±4,810
7.2	10,739±1,827	83,761±1,860	14,912±0,281	139,788±1,947
8.1	10,651±0,576	55,722±2,061	7,381±0,285	91,007±1,224
9.1	9,346±0,393	51,121±2,173	5,742±0,329	89,135±2,136
9.2	8,69±0,595	45,905±2,466	5,377±0,214	77,339±1,332
10.1	11,470±1,363	21,454±1,661	7,164±0,496	37,134±0,817

Anexo 2.2. Datos de concentración de la especiación metálica en las muestras de sedimento

Tabla A.2. Concentración de metal (mg/kg) extraído con ácido acético 0,11 mol/L en sedimentos

Puntos	As (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Co (mg/kg)	Cr (mg/kg)
1.1	0,032±0,001	0,460±0,015	0,315±0,011	<L.D.
2.1	0,0331±0,0002	0,682±0,063	0,260±0,006	0,008±0,004
2.2	0,033±0,001	0,784±0,038	0,262±0,015	0,023±0,007
3.1	0,033±0,002	1,136±0,091	0,791±0,069	0,002±0,007
3.2	0,033±0,001	0,910±0,077	0,526±0,037	0,005±0,005
4.1	0,034±0,001	1,869±0,062	1,673±0,018	0,252±0,013
4.2	0,032±0,001	2,248±0,091	1,614±0,058	0,182±0,028
5.1	0,0338±0,0005	4,545±0,101	2,849±0,066	0,345±0,010
5.2	0,0321±0,0003	4,956±0,125	2,869±0,055	0,283±0,027
6.1	0,035±0,002	9,491±0,409	2,973±0,121	0,739±0,060
6.2	0,031±0,001	4,997±0,210	2,624±0,141	0,270±0,031
7.1	0,032±0,001	2,225±0,031	4,309±0,096	0,174±0,013
7.2	0,029±0,001	2,210±0,038	4,199±0,099	0,175±0,015
8.1	0,0309±0,0004	0,693±0,030	0,263±0,014	0,003±0,002
9.1	0,0312±0,0002	0,935±0,101	0,248±0,015	0,016±0,006
9.2	0,029±0,033	1,166±0,057	0,321±0,007	0,027±0,007
10.1	0,029±0,001	0,453±0,058	0,294±0,011	< L.D.

Tabla A.3. Concentración de metal (mg/kg) extraído con DTPA+CaCl₂+TEA en sedimentos

Puntos	As (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Co (mg/kg)	Cr (mg/kg)
1.1	0,06±0,01	0,15±0,02	0,135±0,004	0,0245±0,0002
2.1	0,09±0,02	0,28±0,02	0,28±0,01	0,019±0,001
2.2	0,09±0,01	0,35±0,02	0,204±0,016	0,03679±0,00007
3.1	0,08±0,01	0,51±0,03	0,37±0,02	0,016±0,001
3.2	0,12±0,01	0,58±0,02	0,46±0,02	0,025±0,001
4.1	0,076±0,005	0,59±0,01	0,45±0,01	0,014±0,003
4.2	0,102±0,008	0,96±0,02	0,55±0,01	0,033±0,003
5.1	0,04±0,01	1,53±0,01	0,83±0,02	0,01838±0,00002
5.2	0,06±0,01	1,91±0,03	0,904±0,013	0,028±0,001
6.1	0,08±0,02	7,94±0,08	2,38±0,06	0,059±0,005
6.2	0,06±0,01	1,55±0,05	0,63±0,02	0,03145±0,000003
7.1	0,04±0,01	0,73±0,03	1,59±0,05	0,016±0,001
7.2	0,09±0,01	0,74±0,03	0,65±0,03	0,026±0,001
8.1	0,06±0,01	0,275±0,001	0,165±0,002	0,025±0,003
9.1	0,03±0,01	0,35±0,01	0,107±0,005	0,002±0,002
9.2	0,036±0,012	0,42±0,03	0,138±0,008	0,065±0,002
10.1	0,075±0,005	0,060±0,001	0,12±0,01	0,021±0,004

Anexo 3. Datos biológicos de los peces**Tabla A.4.** *Datos de longitud y peso de los peces analizados*

Muestreo	Punto de muestreo	Pez	Especie	Peso (g)	Longitud (cm)
1	Getares	1	Sargo	143	21
1	Getares	4	Lenguado	236	29
1	Getares	5	Lenguado	115	23
1	Getares	7	Lenguado	225	28
1	Palmones	1	Rubio	355	32
1	Puente Mayorga	1	Rubio	76	19,6
1	Puente Mayorga	2	Lenguado	359	32,5
2	Getares	1	Lenguado	135	24,1
2	Getares	2	Lenguado	135,6	23,9
2	Getares	3	Lenguado	114,1	21,2
2	Getares	4	Lenguado	170,4	25,9
2	Getares	5	Lenguado	149,1	25
2	Getares	6	Lenguado	152,8	25,8
2	Getares	8	Lenguado	182,9	27,5
2	Getares	9	Lenguado	111,9	23
2	Getares	10	Lenguado	130	24,5
2	Getares	11	Lenguado	133,6	23,5
2	Getares	12	Lenguado	273,8	30,5
2	Getares	13	Lenguado	198,9	27,9
2	Getares	14	Sargo	77,2	7,5
2	Getares	15	Lenguado	223	29,2
2	Getares	17	Lenguado	201	28,2
2	Isla Verde	3	Lenguado	241,9	28,7
2	Isla Verde	4	Lenguado	286,6	31,6
2	Isla Verde	5	Lenguado	385,5	36,8
2	Palmones	3	Lenguado	196,9	27,5

Tabla A.4 (cont.). Datos de longitud y peso de los peces analizados

Muestreo	Punto de muestreo	Pez	Especie	Peso (g)	Longitud (cm)
2	Palmones	6	Rubio	339,2	34,5
2	Palmones	7	Rubio	400	37
2	Palmones	8	Rubio	371	34
2	Palmones	8	Rubio	371	38
2	Palmones	9	Rubio	326,6	32,1
2	Palmones	10	Rubio	352,75	33,9
2	Palmones	11	Rubio	290,6	31,2
2	Palmones	12	Rubio	318,6	34,1
2	Palmones	13	Rubio	348,2	32,6
2	Palmones	14	Rubio	400	39
2	Palmones	15	Rubio	305,8	31,9
2	Palmones	16	Rubio	290,3	38,3
2	Palmones	17	Rubio	299,4	31,6
2	Guadarranque	2	Lenguado	213,4	27,9
2	Puente Mayorga	1	Lenguado	235	28,5
2	Puente Mayorga	3	Lenguado	171,9	26
3	Getares	1	Lenguado	173,9	25,4
3	Getares	3	Lenguado	150	24,6
3	Getares	4	Lenguado	256	31
3	Getares	6	Lenguado	237	28,6
3	Getares	7	Lenguado	237	28,5
3	Getares	8	Rascacio	344,95	25,8
3	Getares	10	Rascacio	206,33	20
3	Getares	11	Lenguado	348	35
3	Getares	12	Rascacio	324	25
3	Getares	12	Rascacio	324	25
3	Getares	13	Rascacio	>440	34,6
3	Getares	13	Rascacio	>440	34,3

Tabla A.4 (cont.). Datos de longitud y peso de los peces analizados

Muestreo	Punto de muestreo	Pez	Especie	Peso (g)	Longitud (cm)
3	Isla Verde	7	Rascacio	>440	31
3	Isla Verde	8	Rascacio	238,5	28
3	Isla Verde	9	Rascacio	341	26
3	Palmones	1	Rubio	174,82	26,3
3	Palmones	3	Lenguado	196	26
3	Palmones	4	Lenguado	74,9	20
3	Palmones	5	Rubio	177	27
3	Palmones	6	Lenguado	148	26
3	Palmones	7	Lenguado	217,38	29,5
3	Guadarranque	1	Rubio	175,1	25,8
3	Guadarranque	2	Rascacio	133	18,5
3	Guadarranque	4	Rascacio	108	18
3	Guadarranque	5	Rubio	134,8	23
3	Guadarranque	6	Rubio	135	24
3	Puente Mayorga	2	Lenguado	>440	36
3	Puente Mayorga	3	Lenguado	42,7	35,1
3	Puente Mayorga	4	Lenguado	137	28
4	Getares	1	Lenguado	193,2	25,7
4	Getares	2	Lenguado	193,2	25,7
4	Getares	3	Lenguado	130,2	24
4	Getares	4	Lenguado	121,7	25
4	Getares	5	Lenguado	165,7	25,7
4	Getares	6	Lenguado	117,4	23,3
4	Getares	7	Lenguado	82	20,4
4	Getares	9	Rascacio	149	20
4	Getares	10	Sargo	149	20
4	Isla Verde	2	Sargo	59,8	36
4	Isla Verde	3	Sargo	152,5	21

Tabla A.4 (cont.). Datos de longitud y peso de los peces analizados

Muestreo	Punto de muestreo	Pez	Especie	Peso (g)	Longitud (cm)
4	Guadarranque	1	Lenguado	202	27
4	Guadarranque	4	Rubio	112,5	22,3
4	Guadarranque	9	Rascacio	117,9	17
4	Guadarranque	10	Rascacio	88,4	16,2
4	Guadarranque	11	Rascacio	101,4	17,2

Anexo 4. Base de datos de los metales en cada uno de los compartimentos acuáticos

Anexo 4.1. Datos de concentración de la especiación metálica en las muestras de agua

Tabla A.5. Datos de concentración de la especiación metálica de As en agua ($\mu\text{g/L}$)

Muestreo	Punto de muestreo	Fracción	Concentración ($\mu\text{g/L}$)
1	Getares	Total	0,625 \pm 0,024
1	Getares	Particulada orgánica	0,237 \pm 0,053
1	Getares	Particulada inorgánica	0,000
1	Getares	Disuelta orgánica	0,010 \pm 0,047
1	Getares	Disuelta inorgánica	0,378 \pm 0,047
1	Isla Verde	Total	0,684 \pm 0,048
1	Isla Verde	Particulada orgánica	0,188 \pm 0,136
1	Isla Verde	Particulada inorgánica	0,318 \pm 0,028
1	Isla Verde	Disuelta orgánica	0,082 \pm 0,025
1	Isla Verde	Disuelta inorgánica	0,097 \pm 0,028
1	Palmones	Total	0,556 \pm 0,024
1	Palmones	Particulada orgánica	0,000
1	Palmones	Particulada inorgánica	0,302 \pm 0,047
1	Palmones	Disuelta orgánica	0,062 \pm 0,053
1	Palmones	Disuelta inorgánica	0,192 \pm 0,047
1	Guadarranque	Total	0,665 \pm 0,024

Tabla A.5 (cont.). Datos de concentración de la especiación metálica de As en agua ($\mu\text{g/L}$)

Muestreo	Punto de muestreo	Fracción	Concentración ($\mu\text{g/L}$)
1	Guadarranque	Particulada orgánica	0,000
1	Guadarranque	Particulada inorgánica	0,506 \pm 0,024
1	Guadarranque	Disuelta orgánica	0,115 \pm 0,048
1	Guadarranque	Disuelta inorgánica	0,044 \pm 0,001
1	Puente Mayorga	Total	0,702 \pm 0,024
1	Puente Mayorga	Particulada orgánica	0,204 \pm 0,042
1	Puente Mayorga	Particulada inorgánica	0,320 \pm 0,023
1	Puente Mayorga	Disuelta orgánica	0,004 \pm 0,034
1	Puente Mayorga	Disuelta inorgánica	0,174 \pm 0,023
2	Getares	Total	0,740 \pm 0,001
2	Getares	Particulada orgánica	0,000
2	Getares	Particulada inorgánica	0,268 \pm 0,034
2	Getares	Disuelta orgánica	0,264 \pm 0,034
2	Getares	Disuelta inorgánica	0,208 \pm 0,024
2	Isla Verde	Total	0,627 \pm 0,007
2	Isla Verde	Particulada orgánica	0,174 \pm 0,090
2	Isla Verde	Particulada inorgánica	0,000
2	Isla Verde	Disuelta orgánica	0,000
2	Isla Verde	Disuelta inorgánica	0,453 \pm 0,048
2	Palmones	Total	0,550 \pm 0,001
2	Palmones	Particulada orgánica	0,000
2	Palmones	Particulada inorgánica	0,135 \pm 0,072
2	Palmones	Disuelta orgánica	0,207 \pm 0,087
2	Palmones	Disuelta inorgánica	0,208 \pm 0,072
2	Guadarranque	Total	0,494 \pm 0,048
2	Guadarranque	Particulada orgánica	0,095 \pm 0,064
2	Guadarranque	Particulada inorgánica	0,040 \pm 0,034

Tabla A.5 (cont.). Datos de concentración de la especiación metálica de As en agua ($\mu\text{g/L}$)

Muestreo	Punto de muestreo	Fracción	Concentración ($\mu\text{g/L}$)
2	Guadarranque	Disuelta orgánica	0,000
2	Guadarranque	Disuelta inorgánica	0,359 \pm 0,024
2	Puente Mayorga	Total	0,795 \pm 0,001
2	Puente Mayorga	Particulada orgánica	0,228 \pm 0,059
2	Puente Mayorga	Particulada inorgánica	0,000
2	Puente Mayorga	Disuelta orgánica	0,000
2	Puente Mayorga	Disuelta inorgánica	0,567 \pm 0,048
3	Getares	Total	0,556 \pm 0,025
3	Getares	Particulada orgánica	0,006 \pm 0,062
3	Getares	Particulada inorgánica	0,162 \pm 0,056
3	Getares	Disuelta orgánica	0,214 \pm 0,024
3	Getares	Disuelta inorgánica	0,174 \pm 0,024
3	Isla Verde	Total	0,616 \pm 0,025
3	Isla Verde	Particulada orgánica	0,058 \pm 0,063
3	Isla Verde	Particulada inorgánica	0,379 \pm 0,028
3	Isla Verde	Disuelta orgánica	0,162 \pm 0,027
3	Isla Verde	Disuelta inorgánica	0,017 \pm 0,012
3	Palmones	Total	0,496 \pm 0,051
3	Palmones	Particulada orgánica	0,0738 \pm 0,034
3	Palmones	Particulada inorgánica	0,167 \pm 0,024
3	Palmones	Disuelta orgánica	0,007 \pm 0,034
3	Palmones	Disuelta inorgánica	0,248 \pm 0,024
3	Guadarranque	Total	0,600 \pm 0,025
3	Guadarranque	Particulada orgánica	0,000
3	Guadarranque	Particulada inorgánica	0,440 \pm 0,028
3	Guadarranque	Disuelta orgánica	0,125 \pm 0,050
3	Guadarranque	Disuelta inorgánica	0,035 \pm 0,012
3	Puente Mayorga	Total	0,707 \pm 0,025
3	Puente Mayorga	Particulada orgánica	0,112 \pm 0,049

Tabla A.5 (cont.). Datos de concentración de la especiación metálica de As en agua ($\mu\text{g/L}$)

Muestreo	Punto de muestreo	Fracción	Concentración ($\mu\text{g/L}$)
3	Puente Mayorga	Particulada inorgánica	0,384 \pm 0,035
3	Puente Mayorga	Disuelta orgánica	0,000
3	Puente Mayorga	Disuelta inorgánica	0,211 \pm 0,024
4	Getares	Total	0,734 \pm 0,051
4	Getares	Particulada orgánica	0,152 \pm 0,066
4	Getares	Particulada inorgánica	0,023 \pm 0,035
4	Getares	Disuelta orgánica	0,266 \pm 0,034
4	Getares	Disuelta inorgánica	0,293 \pm 0,024
4	Isla Verde	Total	0,668 \pm 0,102
4	Isla Verde	Particulada orgánica	0,204 \pm 0,130
4	Isla Verde	Particulada inorgánica	0,000
4	Isla Verde	Disuelta orgánica	0,038 \pm 0,073
4	Isla Verde	Disuelta inorgánica	0,426 \pm 0,073
4	Palmones	Total	0,565 \pm 0,076
4	Palmones	Particulada orgánica	0,000
4	Palmones	Particulada inorgánica	0,082 \pm 0,055
4	Palmones	Disuelta orgánica	0,209 \pm 0,054
4	Palmones	Disuelta inorgánica	0,274 \pm 0,048
4	Guadarranque	Total	0,561 \pm 0,001
4	Guadarranque	Particulada orgánica	0,135 \pm 0,070
4	Guadarranque	Particulada inorgánica	0,000
4	Guadarranque	Disuelta orgánica	0,000
4	Guadarranque	Disuelta inorgánica	0,426 \pm 0,048
4	Puente Mayorga	Total	0,779 \pm 0,025
4	Puente Mayorga	Particulada orgánica	0,239 \pm 0,043
4	Puente Mayorga	Particulada inorgánica	0,000
4	Puente Mayorga	Disuelta orgánica	0,000
4	Puente Mayorga	Disuelta inorgánica	0,540 \pm 0,001

Tabla A.6. Datos de concentración de la especiación metálica de Ni en agua ($\mu\text{g/L}$)

Muestreo	Punto de muestreo	Fracción	Concentración ($\mu\text{g/L}$)
1	Getares	Total	$0,378 \pm 0,016$
1	Getares	Particulada	$0,087 \pm 0,022$
1	Getares	Disuelta lábil	$0,083 \pm 0,001$
1	Getares	Disuelta poco/no lábil	$0,207 \pm 0,016$
1	Isla Verde	Total	$0,285 \pm 0,005$
1	Isla Verde	Particulada	$0,141 \pm 0,006$
1	Isla Verde	Disuelta lábil	$0,106 \pm 0,001$
1	Isla Verde	Disuelta poco/no lábil	$0,039 \pm 0,003$
1	Palmones	Total	$0,294 \pm 0,007$
1	Palmones	Particulada	$0,047 \pm 0,027$
1	Palmones	Disuelta lábil	$0,133 \pm 0,005$
1	Palmones	Disuelta poco/no lábil	$0,115 \pm 0,027$
1	Guadarranque	Total	$0,271 \pm 0,003$
1	Guadarranque	Particulada	$0,040 \pm 0,004$
1	Guadarranque	Disuelta lábil	$0,102 \pm 0,002$
1	Guadarranque	Disuelta poco/no lábil	$0,129 \pm 0,003$
1	Puente Mayorga	Total	$0,233 \pm 0,004$
1	Puente Mayorga	Particulada	$0,026 \pm 0,011$
1	Puente Mayorga	Disuelta lábil	$0,164 \pm 0,003$
1	Puente Mayorga	Disuelta poco/no lábil	$0,042 \pm 0,010$
2	Getares	Total	$0,367 \pm 0,028$
2	Getares	Particulada	$0,260 \pm 0,029$
2	Getares	Disuelta lábil	$0,102 \pm 0,004$
2	Getares	Disuelta poco/no lábil	$0,004 \pm 0,006$
2	Isla Verde	Total	$0,232 \pm 0,015$
2	Isla Verde	Particulada	$0,070 \pm 0,016$
2	Isla Verde	Disuelta lábil	$0,133 \pm 0,004$
2	Isla Verde	Disuelta poco/no lábil	$0,029 \pm 0,007$

Tabla A.6 (cont.). Datos de concentración de la especiación metálica de Ni en agua ($\mu\text{g/L}$)

Muestreo	Punto de muestreo	Fracción	Concentración ($\mu\text{g/L}$)
2	Palmones	Total	0,276 \pm 0,015
2	Palmones	Particulada	0,043 \pm 0,016
2	Palmones	Disuelta lábil	0,034 \pm 0,002
2	Palmones	Disuelta poco/no lábil	0,198 \pm 0,005
2	Guadarranque	Total	0,240 \pm 0,016
2	Guadarranque	Particulada	0,093 \pm 0,018
2	Guadarranque	Disuelta lábil	0,055 \pm 0,001
2	Guadarranque	Disuelta poco/no lábil	0,091 \pm 0,008
2	Puente Mayorga	Total	0,149 \pm 0,001
2	Puente Mayorga	Particulada	0,003 \pm 0,005
2	Puente Mayorga	Disuelta lábil	0,087 \pm 0,005
2	Puente Mayorga	Disuelta poco/no lábil	0,058 \pm 0,007
3	Getares	Total	0,284 \pm 0,011
3	Getares	Particulada	0,102 \pm 0,013
3	Getares	Disuelta lábil	0,051 \pm 0,002
3	Getares	Disuelta poco/no lábil	0,131 \pm 0,007
3	Isla Verde	Total	0,137 \pm 0,008
3	Isla Verde	Particulada	0,040 \pm 0,010
3	Isla Verde	Disuelta lábil	0,079 \pm 0,001
3	Isla Verde	Disuelta poco/no lábil	0,018 \pm 0,005
3	Palmones	Total	0,484 \pm 0,006
3	Palmones	Particulada	0,229 \pm 0,014
3	Palmones	Disuelta lábil	0,157 \pm 0,002
3	Palmones	Disuelta poco/no lábil	0,097 \pm 0,013
3	Guadarranque	Total	0,536 \pm 0,010
3	Guadarranque	Particulada	0,298 \pm 0,012
3	Guadarranque	Disuelta lábil	0,113 \pm 0,002

Tabla A.6 (cont.). Datos de concentración de la especiación metálica de Ni en agua ($\mu\text{g/L}$)

Muestreo	Punto de muestreo	Fracción	Concentración ($\mu\text{g/L}$)
3	Guadarranque	Disuelta poco/no lábil	0,125 \pm 0,007
3	Puente Mayorga	Total	0,197 \pm 0,009
3	Puente Mayorga	Particulada	0,125 \pm 0,009
3	Puente Mayorga	Disuelta lábil	0,041 \pm 0,003
3	Puente Mayorga	Disuelta poco/no lábil	0,030 \pm 0,005
4	Getares	Total	0,189 \pm 0,012
4	Getares	Particulada	0,022 \pm 0,014
4	Getares	Disuelta lábil	0,159 \pm 0,006
4	Getares	Disuelta poco/no lábil	0,008 \pm 0,010
4	Isla Verde	Total	0,245 \pm 0,009
4	Isla Verde	Particulada	0,035 \pm 0,012
4	Isla Verde	Disuelta lábil	0,081 \pm 0,002
4	Isla Verde	Disuelta poco/no lábil	0,129 \pm 0,009
4	Palmones	Total	0,294 \pm 0,014
4	Palmones	Particulada	0,140 \pm 0,015
4	Palmones	Disuelta lábil	0,064 \pm 0,002
4	Palmones	Disuelta poco/no lábil	0,089 \pm 0,007
4	Guadarranque	Total	0,574 \pm 0,019
4	Guadarranque	Particulada	0,232 \pm 0,024
4	Guadarranque	Disuelta lábil	0,202 \pm 0,004
4	Guadarranque	Disuelta poco/no lábil	0,141 \pm 0,016
4	Puente Mayorga	Total	0,146 \pm 0,009
4	Puente Mayorga	Particulada	0,040 \pm 0,014
4	Puente Mayorga	Disuelta lábil	0,102 \pm 0,002
4	Puente Mayorga	Disuelta poco/no lábil	0,004 \pm 0,011

Tabla A.7. Datos de concentración de la especiación metálica de Co en agua ($\mu\text{g/L}$)

Muestreo	Punto de muestreo	Fracción	Concentración ($\mu\text{g/L}$)
1	Getares	Total	$0,022 \pm 0,002$
1	Getares	Particulada	$0,019 \pm 0,002$
1	Getares	Disuelta lábil	<LD
1	Getares	Disuelta poco/no lábil	$0,0035 \pm 0,0002$
1	Isla Verde	Total	$0,035 \pm 0,001$
1	Isla Verde	Particulada	$0,027 \pm 0,002$
1	Isla Verde	Disuelta lábil	<LD
1	Isla Verde	Disuelta poco/no lábil	$0,008 \pm 0,001$
1	Palmones	Total	$0,099 \pm 0,002$
1	Palmones	Particulada	$0,049 \pm 0,002$
1	Palmones	Disuelta lábil	$0,0205 \pm 0,0003$
1	Palmones	Disuelta poco/no lábil	$0,030 \pm 0,001$
1	Guadarranque	Total	$0,559 \pm 0,010$
1	Guadarranque	Particulada	$0,398 \pm 0,010$
1	Guadarranque	Disuelta lábil	$0,031 \pm 0,002$
1	Guadarranque	Disuelta poco/no lábil	$0,130 \pm 0,004$
1	Puente Mayorga	Total	$0,047 \pm 0,001$
1	Puente Mayorga	Particulada	$0,043 \pm 0,001$
1	Puente Mayorga	Disuelta lábil	<LD
1	Puente Mayorga	Disuelta poco/no lábil	$0,0043 \pm 0,0002$
2	Getares	Total	$0,032 \pm 0,001$
2	Getares	Particulada	$0,018 \pm 0,002$
2	Getares	Disuelta lábil	<LD
2	Getares	Disuelta poco/no lábil	$0,013 \pm 0,002$
2	Isla Verde	Total	$0,0460 \pm 0,0003$
2	Isla Verde	Particulada	0,000
2	Isla Verde	Disuelta lábil	<LD
2	Isla Verde	Disuelta poco/no lábil	$0,0466 \pm 0,0004$

Tabla A.7 (cont.). Datos de concentración de la especiación metálica de Co en agua ($\mu\text{g/L}$)

Muestreo	Punto de muestreo	Fracción	Concentración ($\mu\text{g/L}$)
2	Palmones	Total	0,122 \pm 0,008
2	Palmones	Particulada	0,095 \pm 0,008
2	Palmones	Disuelta lábil	0,0012 \pm 0,0001
2	Palmones	Disuelta poco/no lábil	0,026 \pm 0,001
2	Guadarranque	Total	0,143 \pm 0,007
2	Guadarranque	Particulada	0,117 \pm 0,007
2	Guadarranque	Disuelta lábil	0,012 \pm 0,001
2	Guadarranque	Disuelta poco/no lábil	0,014 \pm 0,002
2	Puente Mayorga	Total	0,107 \pm 0,002
2	Puente Mayorga	Particulada	0,041 \pm 0,002
2	Puente Mayorga	Disuelta lábil	0,0216 \pm 0,0003
2	Puente Mayorga	Disuelta poco/no lábil	0,0447 \pm 0,0005
3	Getares	Total	0,044 \pm 0,002
3	Getares	Particulada	0,023 \pm 0,002
3	Getares	Disuelta lábil	<LD
3	Getares	Disuelta poco/no lábil	0,021 \pm 0,002
3	Isla Verde	Total	0,034 \pm 0,006
3	Isla Verde	Particulada	0,0002 \pm 0,006
3	Isla Verde	Disuelta lábil	0,010 \pm 0,001
3	Isla Verde	Disuelta poco/no lábil	0,024 \pm 0,002
3	Palmones	Total	0,153 \pm 0,002
3	Palmones	Particulada	0,082 \pm 0,002
3	Palmones	Disuelta lábil	0,056 \pm 0,003
3	Palmones	Disuelta poco/no lábil	0,016 \pm 0,003
3	Guadarranque	Total	0,752 \pm 0,008
3	Guadarranque	Particulada	0,499 \pm 0,009
3	Guadarranque	Disuelta lábil	0,114 \pm 0,010

Tabla A.7 (cont.). Datos de concentración de la especiación metálica de Co en agua ($\mu\text{g/L}$)

Muestreo	Punto de muestreo	Fracción	Concentración ($\mu\text{g/L}$)
3	Guadarranque	Disuelta poco/no lábil	0,139 \pm 0,010
3	Puente Mayorga	Total	0,064 \pm 0,002
3	Puente Mayorga	Particulada	0,053 \pm 0,003
3	Puente Mayorga	Disuelta lábil	0,005 \pm 0,001
3	Puente Mayorga	Disuelta poco/no lábil	0,006 \pm 0,002
4	Getares	Total	0,030 \pm 0,002
4	Getares	Particulada	0,005 \pm 0,002
4	Getares	Disuelta lábil	0,013 \pm 0,001
4	Getares	Disuelta poco/no lábil	0,012 \pm 0,001
4	Isla Verde	Total	0,0286 \pm 0,0002
4	Isla Verde	Particulada	0,012 \pm 0,001
4	Isla Verde	Disuelta lábil	<LD
4	Isla Verde	Disuelta poco/no lábil	0,017 \pm 0,001
4	Palmones	Total	0,064 \pm 0,003
4	Palmones	Particulada	0,015 \pm 0,005
4	Palmones	Disuelta lábil	0,0044 \pm 0,0001
4	Palmones	Disuelta poco/no lábil	0,044 \pm 0,004
4	Guadarranque	Total	0,053 \pm 0,003
4	Guadarranque	Particulada	0,016 \pm 0,004
4	Guadarranque	Disuelta lábil	0,029 \pm 0,001
4	Guadarranque	Disuelta poco/no lábil	0,008 \pm 0,003
4	Puente Mayorga	Total	0,037 \pm 0,002
4	Puente Mayorga	Particulada	0,006 \pm 0,002
4	Puente Mayorga	Disuelta lábil	0,028 \pm 0,002
4	Puente Mayorga	Disuelta poco/no lábil	0,003 \pm 0,002

Tabla A.8. Datos de concentración de la especiación metálica de Cr en agua ($\mu\text{g/L}$)

Muestreo	Punto de muestreo	Fracción	Concentración ($\mu\text{g/L}$)
1	Getares	Total	0,200 \pm 0,015
1	Getares	Particulada	0,012 \pm 0,022
1	Getares	Cr(VI) disuelto	0,093 \pm 0,018
1	Getares	Cr(III) disuelto activo	0,073 \pm 0,030
1	Getares	Cr(III) disuelto no activo	0,022 \pm 0,029
1	Isla Verde	Total	0,422 \pm 0,011
1	Isla Verde	Particulada	0,184 \pm 0,020
1	Isla Verde	Cr(VI) disuelto	0,093 \pm 0,017
1	Isla Verde	Cr(III) disuelto activo	0,106 \pm 0,026
1	Isla Verde	Cr(III) disuelto no activo	0,040 \pm 0,026
1	Palmones	Total	0,310 \pm 0,015
1	Palmones	Particulada	0,008 \pm 0,021
1	Palmones	Cr(VI) disuelto	0,127 \pm 0,010
1	Palmones	Cr(III) disuelto activo	0,079 \pm 0,030
1	Palmones	Cr(III) disuelto no activo	0,097 \pm 0,032
1	Guadarranque	Total	0,493 \pm 0,002
1	Guadarranque	Particulada	0,194 \pm 0,018
1	Guadarranque	Cr(VI) disuelto	0,118 \pm 0,006
1	Guadarranque	Cr(III) disuelto activo	0,093 \pm 0,023
1	Guadarranque	Cr(III) disuelto no activo	0,088 \pm 0,029
1	Puente Mayorga	Total	0,344 \pm 0,018
1	Puente Mayorga	Particulada	0,181 \pm 0,020
1	Puente Mayorga	Cr(VI) disuelto	0,091 \pm 0,003
1	Puente Mayorga	Cr(III) disuelto activo	0,046 \pm 0,025
1	Puente Mayorga	Cr(III) disuelto no activo	0,026 \pm 0,026
2	Getares	Total	0,304 \pm 0,009
2	Getares	Particulada	0,168 \pm 0,013
2	Getares	Cr(VI) disuelto	0,104 \pm 0,018

Tabla A.8 (cont.). Datos de concentración de la especiación metálica de Cr en agua ($\mu\text{g/L}$)

Muestreo	Punto de muestreo	Fracción	Concentración ($\mu\text{g/L}$)
2	Getares	Cr(III) disuelto activo	0,024 \pm 0,031
2	Getares	Cr(III) disuelto no activo	0,008 \pm 0,027
2	Isla Verde	Total	0,555 \pm 0,008
2	Isla Verde	Particulada	0,297 \pm 0,008
2	Isla Verde	Cr(VI) disuelto	0,106 \pm 0,019
2	Isla Verde	Cr(III) disuelto activo	0,119 \pm 0,029
2	Isla Verde	Cr(III) disuelto no activo	0,032 \pm 0,021
2	Palmones	Total	0,478 \pm 0,009
2	Palmones	Particulada	0,209 \pm 0,018
2	Palmones	Cr(VI) disuelto	0,076 \pm 0,017
2	Palmones	Cr(III) disuelto activo	0,071 \pm 0,027
2	Palmones	Cr(III) disuelto no activo	0,122 \pm 0,025
2	Guadarranque	Total	0,520 \pm 0,010
2	Guadarranque	Particulada	0,225 \pm 0,026
2	Guadarranque	Cr(VI) disuelto	0,107 \pm 0,006
2	Guadarranque	Cr(III) disuelto activo	0,059 \pm 0,020
2	Guadarranque	Cr(III) disuelto no activo	0,129 \pm 0,030
2	Puente Mayorga	Total	0,495 \pm 0,016
2	Puente Mayorga	Particulada	0,399 \pm 0,017
2	Puente Mayorga	Cr(VI) disuelto	0,061 \pm 0,020
2	Puente Mayorga	Cr(III) disuelto activo	0,016 \pm 0,027
2	Puente Mayorga	Cr(III) disuelto no activo	0,019 \pm 0,020
3	Getares	Total	0,408 \pm 0,010
3	Getares	Particulada	0,196 \pm 0,019
3	Getares	Cr(VI) disuelto	0,113 \pm 0,012
3	Getares	Cr(III) disuelto activo	0,024 \pm 0,017
3	Getares	Cr(III) disuelto no activo	0,074 \pm 0,020

Tabla A.8 (cont.). Datos de concentración de la especiación metálica de Cr en agua ($\mu\text{g/L}$)

Muestreo	Punto de muestreo	Fracción	Concentración ($\mu\text{g/L}$)
3	Isla Verde	Total	0,426 \pm 0,017
3	Isla Verde	Particulada	0,180 \pm 0,027
3	Isla Verde	Cr(VI) disuelto	0,173 \pm 0,019
3	Isla Verde	Cr(III) disuelto activo	0,061 \pm 0,021
3	Isla Verde	Cr(III) disuelto no activo	0,012 \pm 0,023
3	Palmones	Total	0,287 \pm 0,011
3	Palmones	Particulada	0,019 \pm 0,013
3	Palmones	Cr(VI) disuelto	0,173 \pm 0,009
3	Palmones	Cr(III) disuelto activo	0,033 \pm 0,017
3	Palmones	Cr(III) disuelto no activo	0,062 \pm 0,016
3	Guadarranque	Total	0,538 \pm 0,020
3	Guadarranque	Particulada	0,298 \pm 0,021
3	Guadarranque	Cr(VI) disuelto	0,178 \pm 0,015
3	Guadarranque	Cr(III) disuelto activo	0,050 \pm 0,015
3	Guadarranque	Cr(III) disuelto no activo	0,011 \pm 0,006
3	Puente Mayorga	Total	0,477 \pm 0,017
3	Puente Mayorga	Particulada	0,271 \pm 0,028
3	Puente Mayorga	Cr(VI) disuelto	0,123 \pm 0,008
3	Puente Mayorga	Cr(III) disuelto activo	0,059 \pm 0,020
3	Puente Mayorga	Cr(III) disuelto no activo	0,024 \pm 0,028
4	Getares	Total	0,324 \pm 0,010
4	Getares	Particulada	0,087 \pm 0,029
4	Getares	Cr(VI) disuelto	0,109 \pm 0,004
4	Getares	Cr(III) disuelto activo	0,067 \pm 0,009
4	Getares	Cr(III) disuelto no activo	0,061 \pm 0,028
4	Isla Verde	Total	0,392 \pm 0,016
4	Isla Verde	Particulada	0,055 \pm 0,022

Tabla A.8 (cont.). Datos de concentración de la especiación metálica de Cr en agua ($\mu\text{g/L}$)

Muestreo	Punto de muestreo	Fracción	Concentración ($\mu\text{g/L}$)
4	Isla Verde	Cr(VI) disuelto	$0,165 \pm 0,014$
4	Isla Verde	Cr(III) disuelto activo	$0,089 \pm 0,016$
4	Isla Verde	Cr(III) disuelto no activo	$0,083 \pm 0,018$
4	Palmones	Total	$0,383 \pm 0,014$
4	Palmones	Particulada	$0,052 \pm 0,023$
4	Palmones	Cr(VI) disuelto	$0,180 \pm 0,012$
4	Palmones	Cr(III) disuelto activo	$0,071 \pm 0,021$
4	Palmones	Cr(III) disuelto no activo	$0,081 \pm 0,026$
4	Guadarranque	Total	$0,395 \pm 0,021$
4	Guadarranque	Particulada	$0,048 \pm 0,026$
4	Guadarranque	Cr(VI) disuelto	$0,093 \pm 0,012$
4	Guadarranque	Cr(III) disuelto activo	$0,162 \pm 0,029$
4	Guadarranque	Cr(III) disuelto no activo	$0,092 \pm 0,030$
4	Puente Mayorga	Total	$0,302 \pm 0,010$
4	Puente Mayorga	Particulada	$0,106 \pm 0,020$
4	Puente Mayorga	Cr(VI) disuelto	$0,073 \pm 0,014$
4	Puente Mayorga	Cr(III) disuelto activo	$0,091 \pm 0,022$
4	Puente Mayorga	Cr(III) disuelto no activo	$0,032 \pm 0,024$

Anexo 4.2. Datos de concentración de la especiación metálica en las muestras de sedimentos

Tabla A.9. Datos de concentración de especiación: As, Ni, Co y Cr en sedimentos (mg/kg)

Muestreo	Punto de muestreo	Fracción	As	Ni	Co	Cr
1	Getares	Intercambiable	0,233	0,709	0,177	<LD
1	Getares	Reducible	1,045	0,303	0,243	0,412
1	Getares	Oxidable	0,925	1,458	1,392	7,190
1	Getares	Residuo	12,870	36,872	10,850	63,738
1	Isla Verde	Intercambiable	0,488	0,704	0,912	<LD
1	Isla Verde	Reducible	0,764	0,730	0,415	<LD
1	Isla Verde	Oxidable	1,583	2,890	3,394	7,702
1	Isla Verde	Residuo	35,780	91,774	19,922	227,420
1	Palmones	Intercambiable	0,368	10,406	4,098	1,355
1	Palmones	Reducible	0,904	14,863	2,881	19,100
1	Palmones	Oxidable	0,400	10,354	1,609	24,379
1	Palmones	Residuo	4,422	72,646	12,154	220,103
1	Guadarranque	Intercambiable	0,317	4,044	12,936	0,529
1	Guadarranque	Reducible	1,941	11,241	6,796	8,054
1	Guadarranque	Oxidable	0,698	10,710	3,800	16,448
1	Guadarranque	Residuo	1,490	77,995	7,920	206,190
1	Puente Mayorga	Intercambiable	0,431	0,961	0,835	0,138
1	Puente Mayorga	Reducible	1,229	0,699	0,252	<LD
1	Puente Mayorga	Oxidable	0,953	4,047	1,701	5,604
1	Puente Mayorga	Residuo	7,724	88,090	10,928	169,472
2	Getares	Intercambiable	0,317	0,438	0,469	1,815
2	Getares	Reducible	0,676	<LD	0,670	0,000
2	Getares	Oxidable	0,899	5,217	2,094	3,392
2	Getares	Residuo	7,103	25,615	5,934	44,736
2	Isla Verde	Intercambiable	0,497	0,574	0,615	<LD
2	Isla Verde	Reducible	1,862	0,034	0,184	<LD

Tabla A.9 (cont.). Datos de concentración de especiación: As, Ni, Co y Cr en sedimentos (mg/kg)

Muestreo	Punto de muestreo	Fracción	As	Ni	Co	Cr
2	Isla Verde	Oxidable	1,024	1,612	1,418	7,252
2	Isla Verde	Residuo	21,063	65,617	11,736	164,573
2	Palmones	Intercambiable	0,140	4,856	2,810	0,476
2	Palmones	Reducible	0,805	9,990	2,164	8,145
2	Palmones	Oxidable	0,200	8,361	1,273	10,867
2	Palmones	Residuo	1,216	134,311	12,884	344,192
2	Guadarranque	Intercambiable	0,307	2,902	3,931	0,919
2	Guadarranque	Reducible	0,591	10,474	2,783	7,735
2	Guadarranque	Oxidable	0,304	9,222	1,429	11,117
2	Guadarranque	Residuo	0,146	49,966	5,133	127,999
2	Puente Mayorga	Intercambiable	0,208	1,770	1,603	0,733
2	Puente Mayorga	Reducible	1,305	18,511	2,627	9,770
2	Puente Mayorga	Oxidable	0,356	11,230	1,001	8,009
2	Puente Mayorga	Residuo	1,488	65,681	6,066	228,244
3	Getares	Intercambiable	0,313	1,124	0,271	0,169
3	Getares	Reducible	0,624	0,722	0,062	<LD
3	Getares	Oxidable	0,719	2,221	1,305	5,332
3	Getares	Residuo	16,836	55,434	9,776	111,438
3	Isla Verde	Intercambiable	0,448	1,266	0,587	0,122
3	Isla Verde	Reducible	0,647	0,161	0,106	<LD
3	Isla Verde	Oxidable	0,942	2,770	1,912	8,700
3	Isla Verde	Residuo	27,740	98,673	13,847	256,171
3	Palmones	Intercambiable	0,248	3,486	1,666	0,783
3	Palmones	Reducible	1,242	10,082	2,002	10,256
3	Palmones	Oxidable	0,227	8,404	1,282	13,315
3	Palmones	Residuo	4,295	79,653	8,481	206,086
3	Guadarranque	Intercambiable	0,175	2,524	5,432	0,420

Tabla A.9 (cont.). Datos de concentración de especiación: As, Ni, Co y Cr en sedimentos (mg/kg)

Muestreo	Punto de muestreo	Fracción	As	Ni	Co	Cr
3	Guadarranque	Reducible	1,856	10,271	5,332	10,002
3	Guadarranque	Oxidable	0,465	10,030	3,464	13,554
3	Guadarranque	Residuo	7,452	75,665	7,385	203,756
3	Puente Mayorga	Intercambiable	0,446	2,427	0,808	0,265
3	Puente Mayorga	Reducible	1,631	10,151	2,036	6,295
3	Puente Mayorga	Oxidable	0,674	7,547	1,177	8,320
3	Puente Mayorga	Residuo	10,575	69,671	8,151	153,956
4	Getares	Intercambiable	0,325	1,155	0,254	0,235
4	Getares	Reducible	0,766	1,397	0,047	<LD
4	Getares	Oxidable	0,594	2,055	0,847	3,169
4	Getares	Residuo	10,924	44,634	7,100	89,870
4	Isla Verde	Intercambiable	0,467	1,435	0,413	0,389
4	Isla Verde	Reducible	0,766	0,145	0,078	<LD
4	Isla Verde	Oxidable	0,852	1,477	1,167	6,185
4	Isla Verde	Residuo	22,696	66,280	9,986	167,525
4	Palmones	Intercambiable	0,228	3,341	1,936	0,712
4	Palmones	Reducible	0,920	5,291	1,861	5,128
4	Palmones	Oxidable	0,144	6,261	1,114	9,950
4	Palmones	Residuo	5,994	51,933	8,377	153,534
4	Guadarranque	Intercambiable	0,266	1,473	1,564	0,791
4	Guadarranque	Reducible	0,911	11,889	1,805	9,137
4	Guadarranque	Oxidable	0,175	7,522	0,746	6,836
4	Guadarranque	Residuo	2,398	45,298	3,629	148,054
4	Puente Mayorga	Intercambiable	0,292	1,650	0,469	0,168
4	Puente Mayorga	Reducible	1,333	9,085	2,350	7,916
4	Puente Mayorga	Oxidable	0,492	7,952	0,843	7,848
4	Puente Mayorga	Residuo	7,652	56,753	6,224	128,534

Anexo 4.3. Datos de concentración de concentración metálica en las muestras de peces**Tabla A.10. Datos de concentración de As, Ni, Co y Cr en peces (mg/kg)**

Muestreo	Punto de muestreo	Nº pez	Especie ¹	Tejido ²	As	Ni	Co	Cr
1	Getares	1	S	H	20,145	0,049	0,105	0,081
1	Getares	1	S	B	4,268	1,341	1,838	0,846
1	Getares	1	S	M	4,768	2,337	0,728	0,480
1	Getares	4	L	H	13,926	0,118	0,186	0,291
1	Getares	4	L	B	4,288	0,454	0,276	1,496
1	Getares	4	L	M	27,78	<LD	0,072	0,270
1	Getares	5	L	H	12,638	0,065	0,136	0,225
1	Getares	5	L	B	4,116	0,157	0,181	0,979
1	Getares	5	L	M	14,868	0,126	0,035	0,504
1	Getares	7	L	H	20,488	0,041	0,098	0,118
1	Getares	7	L	B	5,533	0,096	0,109	0,856
1	Getares	7	L	M	20,188	<LD	0,052	0,211
1	Palmones	1	Ru	H	2,499	0,129	1,015	0,037
1	Palmones	1	Ru	M	4,680	0,110	0,115	0,505
1	Puente Mayorga	1	Ru	H	19,953	0,536	0,737	0,226
1	Puente Mayorga	1	Ru	B	15,120	0,108	0,194	0,188
1	Puente Mayorga	1	Ru	M	18,36	0,079	0,133	0,347
1	Puente Mayorga	2	L	H	376,725	0,467	0,187	0,176
1	Puente Mayorga	2	L	B	26,655	0,725	0,247	1,277
1	Puente Mayorga	2	L	M	135,056	0,264	0,050	0,612
2	Getares	1	L	H	15,359	0,168	0,27	<LD
2	Getares	1	L	B	5,185	0,429	0,228	0,358
2	Getares	1	L	M	41,322	0,165	0,050	0,254
2	Getares	2	L	B	7,758	0,307	0,161	1,005
2	Getares	2	L	M	46,770	<LD	0,017	0,074

¹ S: Sargo; L: Lenguado; Ru: Rubio; Ra: Rascacio² H: Hígado; B: Branquias; M: Músculo

Tabla A.10 (cont.). Datos de concentración de As, Ni, Co y Cr en peces (mg/kg)

Muestreo	Punto de muestreo	Nº pez	Especie ¹	Tejido ²	As	Ni	Co	Cr
2	Getares	3	L	H	225,328	13,847	2,716	16,65
2	Getares	3	L	B	6,999	1,690	0,191	1,030
2	Getares	3	L	M	26,245	0,161	0,04	0,253
2	Getares	4	L	H	18,328	0,09	0,416	0,062
2	Getares	4	L	M	49,267	0,001	0,043	0,106
2	Getares	5	L	H	94,26	0,334	0,532	0,186
2	Getares	5	L	B	8,602	0,193	0,267	0,425
2	Getares	5	L	M	84,664	0,257	0,029	0,039
2	Getares	5	L	B	5,471	0,378	0,191	0,718
2	Getares	6	L	B	7,009	1,087	0,241	1,713
2	Getares	6	L	M	59,272	0,206	0,039	0,366
2	Getares	8	L	H	69,842	0,119	0,441	0,119
2	Getares	8	L	B	8,776	0,239	0,278	0,667
2	Getares	8	L	M	58,082	0,072	0,041	0,23
2	Getares	9	L	B	4,582	<LD	0,207	0,371
2	Getares	9	L	M	24,495	<LD	0,007	0,036
2	Getares	10	L	H	11,868	0,122	0,114	0,012
2	Getares	10	L	B	4,186	0,883	0,145	2,079
2	Getares	10	L	M	35,001	0,089	0,024	0,377
2	Getares	11	L	H	15,929	0,034	0,188	0,051
2	Getares	11	L	B	6,533	0,101	0,226	0,450
2	Getares	11	L	M	39,534	<LD	0,007	0,006
2	Getares	12	L	B	8,75	0,977	0,453	0,682
2	Getares	12	L	M	72,277	0,234	0,03	0,171
2	Getares	13	L	H	16,311	0,075	0,214	0,082
2	Getares	13	L	B	3,674	0,296	0,128	0,647
2	Getares	13	L	M	30,868	0,046	0,025	0,363

¹ S: Sargo; L: Lengado; Ru: Rubio; Ra: Rascacio² H: Hígado; B: Branquias; M: Músculo

Tabla A.10 (cont.). Datos de concentración de As, Ni, Co y Cr en peces (mg/kg)

Muestreo	Punto de muestreo	Nº pez	Especie ¹	Tejido ²	As	Ni	Co	Cr
2	Getares	14	S	H	19,002	0,180	0,603	0,065
2	Getares	14	S	B	13,253	0,244	0,203	0,418
2	Getares	14	S	M	28,195	<LD	0,012	<LD
2	Getares	15	L	H	88,966	0,042	0,263	0,016
2	Getares	15	L	B	9,045	0,909	0,257	0,439
2	Getares	15	L	M	75,101	0,109	0,061	0,447
2	Getares	17	L	H	138,046	0,357	0,462	0,099
2	Getares	17	L	B	21,525	0,410	0,144	1,064
2	Getares	17	L	M	50,776	0,001	0,017	0,260
2	Isla Verde	3	L	H	168,581	0,204	0,108	0,036
2	Isla Verde	3	L	B	11,497	1,480	0,489	2,395
2	Isla Verde	3	L	M	77,512	<LD	0,015	0,024
2	Isla Verde	4	L	B	10,448	0,383	0,126	0,328
2	Isla Verde	4	L	M	46,398	0,158	0,045	0,351
2	Isla Verde	5	L	B	44,253	0,388	0,323	0,375
2	Isla Verde	5	L	M	165,927	<LD	0,020	0,115
2	Palmones	3	L	H	55,378	0,072	0,275	0,059
2	Palmones	3	L	B	21,651	0,535	0,308	1,753
2	Palmones	3	L	M	130,318	<LD	0,004	0,038
2	Palmones	6	Ru	H	9,985	0,103	2,522	0,022
2	Palmones	6	Ru	B	6,953	0,352	0,445	0,293
2	Palmones	6	Ru	M	9,285	0,433	0,060	0,111
2	Palmones	7	Ru	H	71,327	0,062	1,373	0,194
2	Palmones	7	Ru	B	36,811	0,380	0,496	0,348
2	Palmones	7	Ru	M	27,576	<LD	0,119	0,062
2	Palmones	8	Ru	B	37,627	0,652	0,776	1,319
2	Palmones	8	Ru	M	40,938	<LD	0,155	0,197

¹ S: Sargo; L: Lengado; Ru: Rubio; Ra: Rascacio² H: Hígado; B: Branquias; M: Músculo

Tabla A.10 (cont.). Datos de concentración de As, Ni, Co y Cr en peces (mg/kg)

Muestreo	Punto de muestreo	Nº pez	Especie ¹	Tejido ²	As	Ni	Co	Cr
2	Palmones	8	Ru	M	82,574	0,104	3,477	0,04
2	Palmones	9	Ru	H	16,984	0,263	1,691	0,175
2	Palmones	9	Ru	B	16,35	0,596	0,728	0,708
2	Palmones	9	Ru	M	29,994	0,012	0,165	0,118
2	Palmones	10	Ru	H	6,363	0,430	4,549	0,009
2	Palmones	10	Ru	B	5,468	0,659	0,574	1,078
2	Palmones	10	Ru	M	5,584	0,025	0,078	0,058
2	Palmones	11	Ru	H	9,059	0,131	2,114	0,062
2	Palmones	11	Ru	B	11,499	1,137	0,701	2,478
2	Palmones	11	Ru	M	12,057	<LD	0,113	0,083
2	Palmones	12	Ru	H	18,368	0,152	3,631	0,040
2	Palmones	12	Ru	B	17,309	0,501	0,529	0,614
2	Palmones	12	Ru	M	33,856	0,034	0,056	0,097
2	Palmones	13	Ru	H	21,182	0,021	1,146	<LD
2	Palmones	13	Ru	B	20,91	0,619	0,554	0,595
2	Palmones	13	Ru	M	29,144	<LD	0,061	0,067
2	Palmones	14	Ru	H	48,743	0,033	3,288	0,042
2	Palmones	14	Ru	B	20,085	0,791	0,808	0,828
2	Palmones	14	Ru	M	25,532	<LD	0,133	0,153
2	Palmones	15	Ru	H	12,951	0,124	1,562	0,046
2	Palmones	15	Ru	B	10,449	0,419	0,619	0,931
2	Palmones	15	Ru	M	21,967	<LD	0,144	0,248
2	Palmones	16	Ru	H	10,712	0,249	2,482	0,063
2	Palmones	16	Ru	B	14,247	0,958	0,956	1,782
2	Palmones	16	Ru	M	13,953	0,242	0,107	0,065
2	Palmones	17	Ru	H	23,653	0,152	1,865	0,075
2	Palmones	17	Ru	B	16,837	0,349	0,582	0,568

¹ S: Sargo; L: Lenguado; Ru: Rubio; Ra: Rascacio² H: Hígado; B: Branquias; M: Músculo

Tabla A.10 (cont.). Datos de concentración de As, Ni, Co y Cr en peces (mg/kg)

Muestreo	Punto de muestreo	Nº pez	Especie ¹	Tejido ²	As	Ni	Co	Cr
2	Palmones	17	Ru	M	20,797	<LD	0,078	0,092
2	Guadarranque	2	L	H	23,893	0,142	0,231	0,078
2	Guadarranque	2	L	B	6,801	0,231	0,270	0,201
2	Guadarranque	2	L	M	58,561	0,045	0,041	0,373
2	Puente Mayorga	1	L	H	76,941	0,042	0,199	0,223
2	Puente Mayorga	1	L	B	79,794	0,283	6,703	0,571
2	Puente Mayorga	1	L	M	116,518	<LD	0,017	0,176
2	Puente Mayorga	3	L	H	28,002	<LD	0,244	0,055
2	Puente Mayorga	3	L	B	8,640	0,055	0,190	0,488
2	Puente Mayorga	3	L	M	112,899	0,019	0,010	0,206
3	Getares	1	L	H	17,005	0,191	0,170	<LD
3	Getares	1	L	B	5,412	0,044	0,242	0,25
3	Getares	1	L	M	34,832	0,044	0,078	0,153
3	Getares	3	L	H	21,223	0,323	0,449	0,121
3	Getares	3	L	M	34,163	<LD	0,041	0,326
3	Getares	4	L	H	46,965	0,437	0,288	<LD
3	Getares	4	L	B	2,100	0,385	0,386	1,953
3	Getares	4	L	M	75,106	0,071	0,018	0,062
3	Getares	6	L	B	4,215	0,756	0,232	0,042
3	Getares	6	L	M	37,460	0,413	0,067	0,510
3	Getares	7	Ra	H	20,900	0,249	0,387	0,044
3	Getares	7	L	B	4,584	0,074	0,316	0,554
3	Getares	7	L	M	47,406	0,014	0,094	0,223
3	Getares	8	Ra	H	13,354	0,127	1,464	<LD
3	Getares	8	Ra	B	2,633	0,478	0,407	0,319
3	Getares	8	Ra	M	8,216	<LD	0,047	0,524
3	Getares	8	Ra	B	4,990	0,488	0,364	0,719

¹ S: Sargo; L: Lengüado; Ru: Rubio; Ra: Rascacio² H: Hígado; B: Branquias; M: Músculo

Tabla A.10 (cont.). Datos de concentración de As, Ni, Co y Cr en peces (mg/kg)

Muestreo	Punto de muestreo	Nº pez	Especie	Tejido	As	Ni	Co	Cr
3	Getares	9	Ru	H	10,363	0,211	0,754	0,009
3	Getares	9	Ru	B	2,930	0,001	0,257	<LD
3	Getares	10	Ra	H	4,323	0,015	0,267	<LD
3	Getares	10	Ra	B	2,611	0,312	0,317	0,108
3	Getares	10	Ra	M	16,584	<LD	0,052	0,026
3	Getares	11	L	H	26,092	0,461	0,236	0,004
3	Getares	11	L	B	1,795	0,061	0,2	0,181
3	Getares	11	L	M	45,893	<LD	0,006	0,096
3	Getares	12	Ra	H	5,58	0,020	0,345	<LD
3	Getares	12	Ra	B	3,526	0,184	0,326	0,048
3	Getares	12	Ra	M	7,199	0,029	0,106	0,692
3	Getares	12	Ra	M	7,516	0,190	0,053	0,342
3	Getares	13	Ra	B	2,905	0,196	0,214	0,077
3	Getares	13	Ra	M	3,846	0,072	0,13	0,231
3	Getares	13	Ra	M	6,541	0,025	0,061	0,111
3	Isla Verde	7	L	H	7,827	0,024	0,721	<LD
3	Isla Verde	7	Ra	B	6,23	0,065	0,312	0,351
3	Isla Verde	7	Ra	M	7,567	<LD	0,067	0,391
3	Isla Verde	8	Ra	H	5,752	0,207	1,139	<LD
3	Isla Verde	8	Ra	B	8,894	0,430	0,718	0,214
3	Isla Verde	8	Ra	M	16,787	0,107	0,26	0,256
3	Isla Verde	9	Ra	H	3,365	0,047	0,683	<LD
3	Isla Verde	9	Ra	B	3,344	0,369	0,434	0,182
3	Isla Verde	9	Ra	M	12,327	<LD	0,101	0,142
3	Isla Verde	10	Ra	H	10,838	0,122	4,038	0,049
3	Isla Verde	10	Ra	B	8,839	0,147	0,116	0,009
3	Palmones	1	Ru	B	6,05	0,606	0,389	0,37

¹ S: Sargo; L: Lengüado; Ru: Rubio; Ra: Rascacio² H: Hígado; B: Branquias; M: Músculo

Tabla A.10 (cont.). Datos de concentración de As, Ni, Co y Cr en peces (mg/kg)

Muestreo	Punto de muestreo	Nº pez	Especie	Tejido	As	Ni	Co	Cr
3	Palmones	1	Ru	M	9,881	0,034	0,124	0,157
3	Palmones	3	L	H	14,812	0,147	0,175	0,016
3	Palmones	3	L	M	36,494	0,035	0,075	0,117
3	Palmones	4	L	H	9,299	0,482	0,226	0,272
3	Palmones	4	L	B	2,093	0,517	0,333	2,444
3	Palmones	4	L	M	9,403	0,005	0,025	0,232
3	Palmones	5	Ru	H	11,515	0,346	3,593	<LD
3	Palmones	5	Ru	B	<LD	<LD	<LD	<LD
3	Palmones	5	Ru	M	16,145	<LD	0,059	0,164
3	Palmones	6	L	H	28,548	0,690	0,634	0,754
3	Palmones	6	L	B	5,012	0,910	0,254	0,175
3	Palmones	6	L	M	22,472	0,026	0,046	0,389
3	Palmones	7	L	H	16,639	0,687	1,703	<LD
3	Palmones	7	L	B	4,837	0,191	0,290	0,667
3	Palmones	7	L	M	<LD	<LD	<LD	<LD
3	Guadarranque	1	Ru	H	28,985	1,433	10,294	0,11
3	Guadarranque	1	Ru	B	13,134	0,232	0,840	0,173
3	Guadarranque	1	Ru	M	17,182	<LD	0,096	1,986
3	Guadarranque	2	Ra	H	3,702	0,154	0,39	0,019
3	Guadarranque	2	Ra	B	3,506	0,486	0,594	0,197
3	Guadarranque	2	Ra	M	42,025	<LD	0,181	0,134
3	Guadarranque	4	Ra	M	36,494	<LD	0,146	0,27
3	Guadarranque	4	L	H	4,764	0,788	0,52	0,071
3	Guadarranque	4	Ra	B	3,461	0,195	0,591	0,321
3	Guadarranque	5	Ru	H	16,312	0,233	4,321	<LD
3	Guadarranque	5	Ru	B	12,348	0,350	1,093	0,509
3	Guadarranque	5	Ru	M	13,325	<LD	0,12	0,437

¹ S: Sargo; L: Lenguado; Ru: Rubio; Ra: Rascacio² H: Hígado; B: Branquias; M: Músculo

Tabla A.10 (cont.). Datos de concentración de As, Ni, Co y Cr en peces (mg/kg)

Muestreo	Punto de muestreo	Nº pez	Especie	Tejido	As	Ni	Co	Cr
3	Guadarranque	6	Ru	H	14,056	0,519	0,136	<LD
3	Guadarranque	6	Ru	B	9,973	0,226	1,658	0,004
3	Guadarranque	6	Ru	M	22,975	<LD	0,212	0,101
3	Puente Mayorga	1	Ru	H	54,318	0,474	11,036	0,11
3	Puente Mayorga	1	Ru	B	14,105	0,278	1,365	0,204
3	Puente Mayorga	2	L	H	19,03	0,299	0,123	0,046
3	Puente Mayorga	2	L	B	1,833	0,195	0,283	0,089
3	Puente Mayorga	2	L	M	20,383	0,070	0,023	0,163
3	Puente Mayorga	3	L	H	5,216	0,075	0,783	0,049
3	Puente Mayorga	3	L	B	8,391	0,650	0,432	1,072
3	Puente Mayorga	3	L	M	82,723	<LD	0,026	0,612
3	Puente Mayorga	4	L	B	6,264	0,470	0,246	0,553
3	Puente Mayorga	4	L	M	31,252	0,558	0,028	0,108
4	Getares	1	L	H	8,456	0,045	0,071	0,088
4	Getares	1	L	B	3,818	0,643	0,061	0,267
4	Getares	1	L	M	35,846	0,239	0,015	0,588
4	Getares	2	L	H	23,487	0,126	0,146	0,049
4	Getares	2	L	B	5,545	0,811	0,135	0,456
4	Getares	2	L	M	64,190	0,402	0,029	0,333
4	Getares	2	S	H	23,245	0,709	1,971	0,095
4	Getares	3	L	B	5,018	0,845	0,062	0,512
4	Getares	3	L	B	14,880	0,431	0,126	0,493
4	Getares	3	L	M	50,811	0,114	0,007	0,398
4	Getares	4	L	H	10,766	0,312	0,071	0,157
4	Getares	4	L	B	4,203	0,520	0,039	2,509
4	Getares	4	L	M	62,143	0,137	0,012	0,099
4	Getares	4	Ru	H	8,898	0,483	6,347	0,036

¹ S: Sargo; L: Lenguado; Ru: Rubio; Ra: Rascacio² H: Hígado; B: Branquias; M: Músculo

Tabla A.10 (cont.). Datos de concentración de As, Ni, Co y Cr en peces (mg/kg)

Muestreo	Punto de muestreo	Nº pez	Especie	Tejido	As	Ni	Co	Cr
4	Getares	5	L	H	14,351	0,117	0,137	<LD
4	Getares	5	L	B	2,117	1,836	0,107	1,131
4	Getares	5	L	M	37,748	0,276	0,018	0,590
4	Getares	6	L	B	0,314	0,136	0,016	0,189
4	Getares	6	L	M	48,583	0,179	0,011	0,170
4	Getares	7	L	B	3,607	1,650	0,148	2,619
4	Getares	7	L	M	34,636	0,314	0,026	0,383
4	Getares	9	Ra	H	12,161	0,049	0,574	0,061
4	Getares	9	Ra	B	3,798	0,482	0,136	0,357
4	Getares	9	Ra	M	11,664	0,260	0,025	0,415
4	Getares	10	S	H	11,341	0,351	0,703	<LD
4	Getares	10	S	B	5,871	0,248	0,118	0,426
4	Getares	10	S	M	5,434	0,340	0,010	0,274
4	Isla Verde	2	S	B	10,527	0,659	0,437	0,396
4	Isla Verde	2	S	M	29,915	0,319	0,069	0,239
4	Isla Verde	3	S	H	8,576	0,290	0,735	0,040
4	Isla Verde	3	S	B	10,524	0,514	0,295	0,614
4	Isla Verde	3	S	M	24,880	0,238	0,057	0,241
4	Isla Verde	3	L	H	47,409	0,364	0,116	<LD
4	Isla Verde	6	L	H	25,500	0,252	1,396	0,560
4	Guadarranque	1	L	H	16,262	0,048	0,210	0,035
4	Guadarranque	1	L	B	3,755	1,115	0,133	1,739
4	Guadarranque	1	L	M	47,910	0,405	0,017	0,488
4	Guadarranque	2	L	H	9,351	0,026	0,039	<LD
4	Guadarranque	2	L	B	20,023	2,661	0,131	0,907
4	Guadarranque	4	Ru	B	6,364	1,016	0,830	1,550
4	Guadarranque	4	Ru	M	8,340	0,227	0,084	0,690

¹ S: Sargo; L: Lengado; Ru: Rubio; Ra: Rascacio² H: Hígado; B: Branquias; M: Músculo

Tabla A.10 (cont.). Datos de concentración de As, Ni, Co y Cr en peces (mg/kg)

Muestreo	Punto de muestreo	Nº pez	Especie	Tejido	As	Ni	Co	Cr
4	Guadarranque	7	L	H	1,296	0,045	0,040	0,003
4	Guadarranque	9	Ra	H	3,965	0,395	0,428	0,061
4	Guadarranque	9	Ra	B	2,382	1,249	0,299	0,809
4	Guadarranque	9	Ra	M	20,629	0,433	0,185	0,244
4	Guadarranque	10	Ra	B	2,720	0,579	0,411	0,783
4	Guadarranque	10	Ra	M	16,184	0,330	0,098	0,282
4	Guadarranque	11	Ra	H	7,268	0,791	1,170	0,052
4	Guadarranque	11	Ra	B	3,124	0,621	0,500	0,502
4	Guadarranque	11	Ra	M	3,124	0,621	0,500	0,502

¹ S: Sargo; L: Lengado; Ru: Rubio; Ra: Rascacio² H: Hígado; B: Branquias; M: Músculo

Anexo 5. Factores de concentración y enriquecimiento de As, Ni, Co y Cr en peces

Tabla A.11. Factores de concentración y enriquecimiento (mg/kg de tejido/ μ g/L de agua) para As, Ni, Co y Cr en tejidos de lenguados, rascacios, rubios y sargos

Punto de muestreo	Especie	Tejido	As		Ni		Co		Cr	
			CF	ER	CF	ER	CF	ER	CF	ER
Getares	L	H	75,7	130,0	1,0	1,8	15,6	73,4	0,4	0,6
Getares	L	B	13,3	22,7	3,0	5,7	12,2	57,6	4,5	5,7
Getares	L	M	100,7	172,9	0,7	1,2	2,2	10,1	1,4	1,7
Getares	Ra, Ru, S	H	30,0	51,6	1,2	2,3	78,4	369,1	0,2	0,2
Getares	Ra, Ru, S	B	10,4	17,8	2,1	4,0	26,7	125,5	1,7	2,2
Getares	Ra, Ru, S	M	22,1	38,0	1,7	3,3	7,8	36,8	1,6	2,0
Isla Verde	L	H	195,7	255,2	1,4	2,1	22,2	233,7	0,6	0,7
Isla Verde	L	B	69,3	90,3	4,9	7,5	11,9	124,9	3,8	4,5
Isla Verde	L	M	303,3	395,5	0,3	0,5	1,0	10,6	0,6	0,7
Isla Verde	Ra, Ru, S	H	22,4	29,2	1,1	1,7	62,6	658,4	0,1	0,1
Isla Verde	Ra, Ru, S	B	25,3	33,0	2,4	3,7	14,6	153,9	1,1	1,3
Isla Verde	Ra, Ru, S	M	57,4	74,9	0,9	1,3	4,2	44,2	0,9	1,1
Palmones	L	H	70,9	108,2	1,9	4,3	12,2	29,5	0,8	1,1

Tabla A.11 (cont.). Factores de concentración y enriquecimiento (mg/kg de tejido/ μ g/L de agua) para As, Ni, Co y Cr en tejidos de lenguados, rascacios, rubios y sargos

Punto de muestreo	Especie	Tejido	As		Ni		Co		Cr	
			CF	ER	CF	ER	CF	ER	CF	ER
Palmones	L	B	23,9	36,4	2,4	5,5	6,0	14,5	4,3	6,2
Palmones	L	M	113,0	172,4	0,1	0,1	0,6	1,5	0,5	0,8
Palmones	Ra, Ru, S	H	57,6	87,9	0,8	1,7	48,0	116,0	0,2	0,3
Palmones	Ra, Ru, S	B	44,8	68,4	2,6	5,9	11,8	28,5	2,9	4,2
Palmones	Ra, Ru, S	M	68,2	104,1	0,3	0,6	6,4	15,4	0,5	0,7
Guadarranque	L	H	40,3	53,8	0,9	1,8	1,7	4,5	0,1	0,2
Guadarranque	L	B	36,9	49,3	5,6	11,3	1,5	3,8	3,2	4,4
Guadarranque	L	M	192,9	257,5	0,9	1,9	0,2	0,6	1,5	2,0
Guadarranque	Ra, Ru, S	H	44,9	59,9	2,5	5,0	23,4	60,1	0,1	0,2
Guadarranque	Ra, Ru, S	B	23,0	30,6	2,3	4,7	6,4	16,3	1,8	2,5
Guadarranque	Ra, Ru, S	M	78,0	104,1	0,5	1,0	1,2	3,1	1,7	2,3
Puente Mayorga	L	H	270,5	271,3	1,3	1,8	10,9	22,4	0,7	0,8
Puente Mayorga	L	B	58,6	58,8	3,0	4,0	47,8	98,6	4,1	4,8
Puente Mayorga	L	M	222,3	222,9	1,1	1,5	0,9	1,9	1,9	2,2
Puente Mayorga	Ra, Ru, S	H	99,3	99,6	3,8	5,1	208,4	429,9	1,0	1,2
Puente Mayorga	Ra, Ru, S	B	39,1	39,2	1,5	2,0	27,6	56,9	1,2	1,4
Puente Mayorga	Ra, Ru, S	M	49,1	49,2	0,6	0,8	4,7	9,7	2,1	2,5

Referencias

Abadin, H.G., Pohl, H.R., **2010**. Alkyllead compounds and their environmental toxicology. En *Organometallics in Environment and Toxicology, Volume 7: Metal Ions in Life Sciences* (Eds.: Sigel, A., Sigel, H., Sigel, R.K.O.) Royal Society of Chemistry, Cambridge, 153-162.

Abraham, G.M.S., Parker, R.J., **2008**. Assessment of heavy metal enrichment factors and the degree of contamination in marine sediments from Tamaki Estuary, Auckland, New Zealand. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 136, 227-238.

Agotegaray, M.A., Dennehy, M., Boeris, M.A., Grela, M.A., Burrow, R.A., Quinzani, O.V., **2012**. Therapeutic properties, SOD and catecholase mimetic activities of novel ternary copper(II) complexes of the anti-inflammatory drug Fenoprofen with imidazole and caffeine. *Polyhedron* 34, Pages 74-83.

Agrawal, Y.K., **2007**. Poly (β -styryl)-(1,2-methanofullerene-C₆₀)-61-formo hydroxamic acid for the solid phase extraction, separation and preconcentration of rare earth elements. *Fullerenes, Nanotubes, and Carbon Nanostructures* 15, 353-365.

Ahuja, S., **2008**. Arsenic contamination of groundwater: mechanism, analysis, and remediation. Ed. John Wiley & Sons, New Jersey (Estados Unidos).

Alagarsamy, R., **2006**. Distribution and seasonal variation of trace metals in surface sediments of the Mandovi estuary, west coast of India. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 67, 333-339.

Allan, I.J., Vrana, B., Greenwood, R., Mills, G.A., Roig, B., Gonzalez, C., **2006**. A "toolbox" for biological and chemical monitoring requirements for the European Union's Water Framework Directive. *Talanta* 69, 302-

322.

Alomary, A.A., Belhadj, S., **2007**. Determination of heavy metals (Cd, Cr, Cu, Fe, Ni, Pb, Zn) by ICP-OES and their speciation in Algerian Mediterranean Sea sediments after a five-stage sequential extraction procedure. *Environmental Monitoring and Assessment* 135, 265-280.

Anagnostou, C., Kaberi, H., Karageorgis, A., **1997**. Environmental impact on the surface sediments of the bay and the gulf of Thessaloniki (Greece) according to the geoaccumulation index classification. International Conference on Water Pollution Proceedings, 269-275.

Annibaldi, A., Illuminati, S., Truzzi, C., Scarponi, G., **2011**. SWASV speciation of Cd, Pb and Cu for the determination of seawater contamination in the area of the Nicole shipwreck (Ancona coast, Central Adriatic Sea). *Marine Pollution Bulletin* 62, 2813-2821.

Aouarram, A., Galindo-Riaño, M.D., García-Vargas, M., Stitou, M., El Yousfi, F., Espada-Bellido, E., **2010**. An efficient approach to designing and optimizing the analysis of Ni(II) by AdCSV in seawater. *Talanta* 82, 1749-1756.

Apostoli, P., Cornelis, R., Duffus, J., Lison, D., Templeton, D., **2006**. Elemental speciation in human health risk assessment, Environmental health criteria 234. Ed. World Health Organization.

Application Bulletin nº116/3e. Voltammetric determination of chromium in small quantities.

Application Bulletin nº231/2e. Voltammetric determination of zinc, cadmium, lead, copper, thallium, nickel and cobalt in water samples according to DIN 38406 Part 16.

Araujo P.W., Brereton R.G., **1996**. Experimental design I. Screening. *Trends in Analytical Chemistry* 15(1), 26-31.

Arellano, J.M., Sarasquete, C., **2005**. Atlas histológico del lenguado senegalés *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). Ed. Consejo superior de investigaciones científica, España, I.S.B.N.:84-00-08389-X

Armendáriz Sáenz, N.I., Aquino Terrazas, M.T., Romero Ortiz, L., Sánchez Villavicencio, M.L., Sobrino Figueroa, A.S., Miranda Arce, M.G., **2008**. Evaluación de los parámetros bioquímicos en tres macrofitas acuáticas expuestas a cobre. *Polibotánica*, 26, 149-158.

Armenta, S., Garrigues, S., de la Guardia, M., **2008**. Green Analytical Chemistry. *Trends in Analytical Chemistry* 27, 497-511.

Artolachipi Acero, A., Calvo Cubero, J., **2006**. El litoral de la provincia de Cádiz. Manual para el profesor. Ed. Junta de Andalucía – Consejería de Medio Ambiente, Sevilla.

Askun, H., Gulbakan, B., Celikbicak, O., Uzun, C., Guven, O., Salih, B., **2008**. Preconcentration and matrix elimination for the determination of Pb(II), Cd(II), Ni(II), and Co(II) by 8-hydroxyquinoline anchored poly(styrene-divinylbenzene) microbeads. *Journal of Applied Polymer Science* 107, 2714-2722.

Aucoin, J., Blanchard, R., Billiot, C., Partridge, C., Shultz, D., Mandhare, K., Beck, M.J., Beck, J.N., **1999**. Trace Metals in fish and sediments from Lake Boeuf Southeastern Louisiana. *Microchemical Journal*, 62, 299-307.

Azcue, J.M., **1993**. Metales en el medio Ambiente. Ed. PPU, Barcelona.

Baeyens, W., Monteny, F., Leermakers, M., Bouillon, S., **2003**. Evaluation of sequential extractions on dry and wet sediments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 376, 890-901.

412

- Bagheri, A., Behbahani, M., Amini, M.M., Sadeghi, O., Taghizade, M., Baghayi, L., Salarian, M., **2012**. Simultaneous separation and determination of trace amounts of Cd(II) and Cu(II) in environmental samples using novel diphenylcarbazine modified nanoporous silica. *Talanta* 89, 455-461.
- Baird, C., **2001**. Environmental chemistry. Ed. W.H. Freeman, 2^a Ed., New York.
- Baird, C., Cann, M., **2005**. Environmental Chemistry, 3rd Ed., W.H. Freeman and Company, United States of America.
- Balzer, W., Boehler, E., Tang, X., Ren, J., Zhang, J., Wang, D., **2012**. Arsenic in solution, colloidal and particulate phases of East-Hainan estuaries. *Continental Shelf Research*, In Press.
- Bard, A.J., Faulkner, L.R., **2001**. Electrochemical Methods. Fundamentals and applications. 2nd Ed. Wiley, New York, USA.
- Batley, G.E., **1987**. Speciation of heavy metals in water, sediments and biota of the Macquarie lake. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research* 38, 591-606.
- Bears, H., Richards, J.G., Shulte, P.M., **2006**. Arsenic exposure alters hepatic arsenic species composition and stress-mediated gene expression in the common killifish. *Aquatic Toxicology* 77, 257-266.
- Bedia, K.K., Elçin, O., Seda, U., Fatma, K., Nathaly, S., Sevim, R., Dimoglo, A., **2006**. Synthesis and characterization of novel hydrazide-hydrazones and the study of their structure-antituberculosis activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 41, 1253-1261.
- Bennett, S.A., Achterberg, E.P., Connelly D.P., Statham, P.J., Fones, G.R., German, C.R., **2008**. The distribution and stabilisation of dissolved Fe in deep-sea hydrothermal plumes. *Earth and Planetary Science Letters* 270, 157-167.
- Berkowitz, B., Dror, I., Yaron, B., **2008**. Contaminant Geochemistry. Interactions and transport in the subsurface environment. Ed. Springer-Verlag, Berlin (Alemania).
- Bettmer, J., **2002**. Elemental speciation. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 372, 33-34.
- Biju, V.M., Rao T.P., **2005**. FAAS determination of selected rare earth elements coupled with multielement solid phase extractive preconcentration. *Chemia Analityczna* 50, 935-944.
- Bissen, M., Frimmel, F.H., **2003**. Arsenic, a review. Part I: Occurrence, toxicity, speciation, Mobility. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica* 31, 9-18.
- Björklund, L. B., Morrison, G. M., **1997**. Determination of copper speciation in freshwater samples through SPE-spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta* 343, 259-266.
- Bobrowski, A., Baś, B., Dominik, J., Niewiara, E., Szalińska, E., Vignati, D., Zarebski, J., **2004**. Chromium speciation study in polluted waters using catalytic adsorptive stripping voltammetry and tangential flow filtration. *Talanta* 63, 1003-1012.
- Boudaya, L., **2000**: Ecobiologie de deux espèces de Triglidae (Pisces, Teleostei) du golfe de Gabes: *Trigloporus lastoviza* (Bonnaterre, 1788) and *Aspitrigla obscura* (Linnaeus, 1764). D. E. A. Faculté des Sciences de Sfax. Université de Sfax, Tunisia.
- Boussemart, M., Van den Berg, C.M.G., Ghaddaf, M., **1992**. The determination of the chromium speciation in sea water using catalytic cathodic stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta* 262, 103-115.
- Boyaci, E., Çağır, A., Shahwan, T., Eroğlu, A. E., **2011**. Synthesis, characterization and application of a novel

mercapto- and amine-bifunctionalized silica for speciation/sorption of inorganic arsenic prior to inductively coupled plasma mass spectrometric determination. *Talanta* 85, 1517-1525.

Bradl, H.B., Kim, C., Kramar, U., Stüben, D., **2005**. Heavy metals in the environment. Chapter 2: Interactions of heavy metals. Ed. Elsevier.

Bruland, K.W., **1983**. Trace elements in seawater, en Chemical Oceanography. Ed. J.P. Riley, R. Chester, London (England): Academic Press.

Bryan, G.W., **1976**. Heavy metal contamination in the sea, en Marine Pollution. Ed. R. Jonhston, London (England): Academic Press.

Buchman, M.F., **2008**. NOAA Screening Quick Reference Tables, NOAA OR&R Report 08-1. Seattle WA, Office of Response and Restoration Division, National Oceanic and Atmospheric Administration, 34 pages.

Buck, K.N., Bruland, K.W., **2005**. Copper speciation in San Francisco Bay: A novel approach using multiple analytical windows. *Marine Chemistry* 96, 185-198.

Buffle, J., Mota, A.M., Simoes Gonçalves, M.L.S., **1987**. Adsorption of fulvic-like organic ligands and their Cd and Pb complexes, at the mercury electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 223, 235-262.

Buffle, J., Tercier-Waeber, M.L., **2005**. Voltammetric environmental trace metal analisis and speciation: from laboratory to in situ measurements. *Trends in Analytical Chemistry* 24, 172-191.

Buffle, J., Zhang, Z., Startchev, K., **2007**. Metal flux and dynamic speciation at (Bio)interfaces. Part I: Critical evaluation and compilation of physicochemical parameters for complexes with simple ligands and fulvic/humic substances. *Environmental Science and Technology* 41, 7609-7620.

Buszewski, B., Szultka, M., **2012**. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 42, 198-213.

Büyüktiryaki, S., Say, R., Denizli, A., Ersoez, A., **2007**. Mimicking receptor for methylmercury preconcentration based on ion-imprinting. *Talanta* 71, 699-705.

Caccia, V.G., Millero, F.J., **2003**. The distribution and seasonal variation of dissolved trace metals in Florida Bay and adjacent waters. *Aquatic Geochemistry* 9, 111-144.

Cámara, C., Fernández, P., Martín-Esteban, A., Pérez-Conde, C., Vidal, M., **2002**. Toma y tratamiento de muestras. Editorial Síntesis. Madrid.

Cámara, C., Pérez-Conde, C., **2011**. Análisis químico de trazas. Ed. Síntesis, España.

Camel, V., **2003**. Solid phase extraction of trace elements. Review. *Spectrochimica Acta Part B* 58, 1177-1233.

Campbell, P.G.C., Errécalde, O., Fortín, C., Hiriart-Baer, V.P., Vigneult, B., **2002**. Metal bioavailability to phytoplankton. Aplicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C 133, 189-206.

Campos, M.L.A., Van den Berg, C.M.G., **1994**. Determination of copper complexation in sea water by cathodic stripping voltammetry and ligand competition with salicylaldoxime. *Analytica Chimica Acta* 284, 481-496.

Canadian Sediment Quality Guidelines for the protection of Aquatic life. Canadian Council of Ministers of Environment, **2002**.

- Cao, G.X., Jimenez, O., Zhou, F., Xu, M., **2006**. Nafion-coated bismuth film and nafion-coated mercury film electrodes for anodic stripping voltammetry combined on-line with ICP-Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 17, 945-952.
- Carman, C.M., Li, X.D., Zhang, G., Wai, O.W.H., Li, Y.S., **2007**. Trace metal distribution in sediments of the Pearl River Estuary and the surrounding coastal area, South China, *Environmental Pollution* 147, 311-323.
- Carrasco, M., López-Rámirez, J.A., Benavente, J., López-Aguayo, F., Sales, D., **2003**. Assessment of urban and industrial contamination levels in the bay of Cádiz, SW Spain. *Marine Pollution Bulletin*, 46, 335-345.
- Caruso, J.A., Klaue, B., Michalke, B., Rocke, D.M., **2003**. Group assessment: elemental speciation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 32-44.
- Castañé, P.M., Topalián M.L., Cordero, R.R., Salibián, A., **2003**. Influencia de la especiación de los metales pesados en medio acuático como determinante de su toxicidad. *Revista de Toxicología* 20, 13-18.
- Caussy, D., Gochfeld, M., Gurzau, E., Neagu, C., Ruedel, H., **2003**. Lessons from case Studies of metals: investigating exposure, bioavailability and risk. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 45-51.
- Censi, P., Spoto, S.E., Saiano, F., Sprovieri, M., Mazzola, S., Nardone, G., Di Geronimo, S.I., Punturo, R., Ottonello, D., **2006**. Heavy metals in coastal water systems. A case study from the northwestern Gulf of Thailand. *Chemosphere* 64, 1167-1176.
- Cesar, A., Choueri, R.B., Riba, I., Morales-Caselles, C., Pereira, C.D.S., Santos, A.R., Abessa, D.M.S., DelValls, T.A., **2007**. Comparative sediment quality assessment in different littoral ecosystems from Spain (Gulf of Cadiz) and Brazil (Santos and São Vicente estuarine system). *Environment International* 33, 429-435.
- Chakraborty, P., Chakrabarti, C.L., **2006**. Chemical speciation of Co, Ni, Cu, and Zn in mine effluents and effects of dilution of the effluent on release of the above metals from their metal-dissolved organic carbon (DOC) complexes. *Analytica Chimica Acta* 571, 260-269.
- Chan, W.H., Xie, T. Y., **1997**. Determination of sub-ppbv levels of formaldehyde in ambient air using Girard's reagent T-coated glass fiber filters and adsorption voltammetry. *Analytica Chimica Acta* 349, 349-357.
- Chand, V., Prasad, S., Prasad, R., **2011**. A study of arsenic contamination by graphite furnace atomic absorption spectrometry in the Lami estuary in Fiji. *Microchemical Journal* 97, 160-164.
- Chapman, P.M., **2007**. Determining when contamination is pollution - Weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environment International* 33, 492-501.
- Chaudhuri, A., Mitra, M., Havrilla, C., Waguespack, Y., Schwarz, J., **2007**. Heavy metal biomonitoring by seaweeds on the Delmarva Peninsula, east coast of the USA. *Botánica Marina* 50, 151-158.
- Cheize, M., Sarthou, G., Croot, P.L., Bucciarelli, E., Baudoux, A-C., Baker, A.R., **2012**. Iron organic speciation determination in rainwater using cathodic stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta* 736, 45-54.
- Chiffolleau, J.F., Cossa, D., Auger, D., Truquet, I., **1994**. Trace metal distribution and fluxes in the Seine estuary (France) in low discharge regime. *Marine Chemistry* 47, 145-158.
- Chito Trujillo, D.M., **2012**. Methodological advancements of AGNES and its implementation for the determination of free metal ion concentrations in synthetic and natural samples. Tesis Doctoral, Universitat de Lleida.

- Chito, D., Weng, L., Galceran, J., Companys, E., Puy, J., van Riemsdijk, W.H., van Leeuwen, H.P., **2012**. Determination of free Zn^{2+} concentration in synthetic and natural samples with AGNES (Absence of Gradients and Nernstian Equilibrium Stripping) and DMT (Donnan Membrane Technique). *Science of the Total Environment* 421-422, 238-244.
- Cho, S.H., Richmond-Bryant, J., Thornburg, J., Portzer, J., Vanderpool, R., Cavender, K., Rice, J., **2011**. A literature review of concentrations and size distributions of ambient airborne Pb-containing particulate matter. *Atmospheric Environment* 45, 5005-5015.
- Choueri, R.B., Cesar, A., Abessa, D.M.S., Torres, R.J., Morais, R.D., Riba, I., Pereira, C.D.S., Nascimento, M.R.L., Mozeto, A.A., DelValls, T.A., **2009**. Development of site-specific sediment quality guidelines for North and South Atlantic littoral zones: Comparison against national and international sediment quality benchmarks. *Journal of Hazardous Materials* 170, 320-331.
- Christensen, J.K., Keiding, K., Kryger, L., Rasmussen, J., Skov, H.J., **1981**. Analog instrument for oxidative and reductive potentiometric stripping analysis. *Analytical Chemistry* 53, 1847-1851.
- Christensen, M.K., Hoyer, B., **2000**. Comparative study of conventional and cellulose acetate-coated mercury film electrodes for speciation of lead in the presence of humic acid. *Electroanalysis* 12, 35-38.
- Christophoridis, C., Dedepsidis, D., Fytianos, K., **2009**. Occurrence and distribution of selected heavy metals in the surface sediments of Thermaikos Gulf, N. Greece. Assessment using pollution indicators. *Journal of Hazardous Materials* 168, 1082-1091.
- Citak, D., Tuzen, M., Soylak, M., **2010**. Speciation of Mn(II), Mn(VII) and total manganese in water and food samples by coprecipitation-atomic absorption spectrometry combination. *Journal of Hazardous Materials* 173, 773-777.
- Cobalt Development Institute, **2004**. Cobalt supply and demand. Guildford, Surrey.
- Comber, S.D.W., Gunn, A.M., Whalley, C., **1995**. Comparison of the partitioning of trace metals in the Humber and Mersey estuaries. *Marine Pollution Bulletin* 30, 851-860.
- Companys, E., Cecilia, J., Codina, G., Puy, J., Galceran, J., **2005**. Determination of Zn^{2+} concentration with AGNES using different strategies to reduce the deposition time, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 576, 21-32.
- Conti, M.E., Tudino, M.B., Muse, J.O., Cecchetti, F., **2002**. Biomonitoring of heavy metals and their species in the marine environment: the contribution of atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma spectrometry. *Research Trends in Applied Spectroscopy* 4, 295-324.
- Coquery, M., Morin, A., Bécue, A., Lepot, B., **2005**. Priority substances of the European Water Framework Directive: analytical challenges in monitoring water quality. *Trends in Analytical Chemistry* 2, 117-127.
- Cordier, C., Vauthier, E., Adenier, A., Lu, Y., Massat, A., Cossé-Barbi, A., **2004**. Salicylaldehyde benzoylhydrazone: Isomerization due to water. A structural analysis using a combination of NMR, IR, and theoretical investigations. *Structural Chemistry* 15, 295-307.
- Creasey, C.L., Flegal, A.R., **1999**. Elemental analyses of groundwater: demonstrated advantage of low-flow sampling and trace metal clean techniques over standar techniques. *Hydrogeology Journal* 7, 161-167.
- Cremlyn, R.J., Ellan, R.M., Farouk, S., **1998**. Synthesis and fungicidal activity of N-(p-sulfonylphenyl)-N1-carbamoylureas. *Pesticide Science* 52, 70-74.

- Crompton, T.R., **2007**. Toxicants in aqueous ecosystems. A guide for the analytical and environmental chemist. Springer-Verlag, Berlín (Alemania).
- Cullen, W.R., Reimer, K.J., **1989**. Arsenic speciation in the environment. *Chemical Reviews* 89, 713-764.
- Culleré, L., Aznar, M., Cacho, J., Ferreira, V., **2003**. Fast fractionation of complex organic extracts by normal-phase chromatography on a solid-phase extraction polymeric sorbent: Optimization of a method to fractionate wine flavor extracts. *Journal of Chromatography A* 1017, 17-26.
- Dadfarnia, S., Shabani, A.M.H., Dehghani, Z., **2006**. Immobilized stearic acid as a new sorbent for online preconcentration and determination of lead by flow injection flame atomic absorption spectrometry. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 17, 548-554.
- Dakova, I., Karadjova, I., Georgieva, V., Georgiev, G., **2009**. Ion-imprinted polymethacrylic microbeads as new sorbent for preconcentration and speciation of mercury. *Talanta* 78, 523-529.
- Dalman, Ö., Karaböcek, S., Demirak, A., Tüfekçi, M., **2003**. Solid phase extraction of copper(II) by modified octadecyl silica membrane disks with 3-{2-[2-(2-hydroxyimino-1-methyl-propylideneamino)-ethylamino]-ethyl-imino}-butan-2-one oxime. *Turkish Journal of Chemistry* 27, 649 - 656.
- Das, D., Gupta, U., Das, A.K., **2012**. Recent developments in solid phase extraction in elemental speciation of environmental samples with special reference to aqueous solutions. *Trends in Analytical Chemistry* 38, 163-171.
- Das, S.K., Chakrapani, G.J., **2011**. Assessment of trace metal toxicity in soils of Raniganj Coalfield, India. *Environmental Monitoring and Assessment* 177, 63-71.
- Datta, S., Ghosh, D., Saha, D.R., Bhattacharaya, S., Mazumder, S., **2009**. Chronic exposure to low concentration of arsenic is immunotoxic to fish: Role of head kidney macrophages as biomarkers of arsenic toxicity to *Clarias batrachus*. *Aquatic Toxicology* 92, 86-94.
- Davidson, M.C., Lorna, E.W., Ure, A.M., 1999. Effect of sample preparation on the operational speciation of cadmium and lead in freshwater sediment. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 363, 134-136.
- De la Guardia, M., Armenta S., **2011**. Chapter 1: Origins of Green Analytical Chemistry; en *Green Analytical Chemistry*, vol. 57, Ed. Elsevier, Oxford (Reino Unido).
- De la Peña, L., Gómez Hens, A., Pérez Bendito, D., **1993**. Simultaneous kinetic-photometric determination of imipramine and desipramine by stopped-flow mixing technique. *Analytica Chimica Acta* 283, 471-475.
- De Souza, A.P.R., Salles, M.O., Braga, E.S., Bertotti, M., **2011**. Determination of dissolved Zn(II) and Cd(II) in estuarine water by using a bismuth film microelectrode. *Electroanalysis* 23, 2511-2515.
- De Vries, W.T., **1968**. Distortion of constant-current chronopotentiograms by double-layer charging. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* 17, 31-43.
- DeFord, D.D., Hume, D.N., **1951**. The determination of consecutive formation constants of complex ions from polarographic data. *Journal of the American Chemical Society* 73, 5321-5322.
- DeForest, D.K., Brix, K.V., Adams, W.J., **2007**. Assessing metal bioaccumulation in aquatic environments: The inverse relationship between bioaccumulation factors, trophic transfer factors and exposure concentration. *Aquatic Toxicology* 84, 236-246.
- del Ramo, J., Torreblanca, A., Díaz Mayans, J., **1993**. Toxicidad de los metales; en Mas, A., Azcue, J.M.; *Metales en Sistemas Biológicos*. Ed. PPU, Barcelona.

- Delibes, M., Cabezas, S., Jiménez, B., González, M.J., **2009**. Animal decisions and conservation: the recolonization of a severely polluted river by the Eurasian otter. *Animal Conservation* 12, 400-407.
- Deshommes, E., Laroche, L., Nour, S., Cartier, C., Prévost, M., **2010**. Source and occurrence of particulate lead in tap water. *Water Research* 44, 3734-3744.
- Dias Filho, N.L., do Carmo, D.R., Rosa, A.H., **2006**. An electroanalytical application of 2-aminothiazole-modified silica gel after adsorption and separation of Hg(II) from heavy metals in aqueous solution. *Electrochimica Acta* 52, 965-972.
- Díaz Mayans, J., Torreblanca, A., del Ramo, J., **1993**. Presencia de metales en el medio acuático; en Mas, A., Azcue, J.M.; Metales en Sistemas Biológicos. Ed. PPU, Barcelona.
- Díaz-de Alba, M., Galindo-Riaño, M.D., Casanueva-Marengo, M.J., García-Vargas, M., Kosore, C.M., **2011**. Assessment of the metal pollution, potential toxicity and speciation of sediment from Algeciras Bay (South of Spain) using chemometric tools. *Journal of Hazardous Materials* 190, 177-187.
- Dindar, M. H., Fathi, S.A.M., Yaftian, M.R., Noushiranzadeh, N., **2010**. Solid phase extraction of copper(II) ions using C18-silica disks modified by oxime ligands. *Journal of Hazardous Materials* 179, 289-294.
- Domènech, X, Peral, J., **2006**. Química Ambiental de sistemas terrestres. Ed. Reverté, España.
- Domingos, R.F., Benedetti, M.F., Pinheiro, J.P., **2007**. Application of permeation liquid membrane and scanned stripping chronopotentiometry to metal speciation analysis of colloidal complexes. *Analytica Chimica Acta* 589, 261-268.
- Domingos, R.F., Huidobro, C., Companys, E., Galceran, J., Puy, J., Pinheiro, J.P., **2008**. Comparison of AGNES (absence of gradients and Nernstian equilibrium stripping) and SSCP (scanned stripping chronopotentiometry) for trace metal speciation analysis. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 617, 141-148.
- Domínguez, M.T., **2012**. La restauración ecológica de zonas contaminadas por la minería: el ejemplo del corredor verde del Guadiamar. *Chronica Naturae*, 2, 15-24.
- Domínguez-Lledó, F.C., Galindo-Riaño, M.D., Díaz-López, I.C., García-Vargas, M., Granado-Castro, M.D., **2007**. Applicability of a liquid membrane in enrichment and determination of nickel traces from natural waters. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389, 653-659.
- Donat, J.R., Van den Berg, C.M.G., **1992**. A new cathodic stripping voltametric for determining organic copper complexation in seawater. *Marine chemistry* 38, 69-90.
- Doong, R.A., Lee, S.H., Lee, C.C., Sun, Y.C., Wu, S.C., **2008**. Characterization and composition of heavy metals and persistent organic pollutants in water and estuarine sediments from Gao-ping River, Taiwan. *Marine Pollution Bulletin* 57, 846-857.
- Duinker, J.C., Kramer, C.J.M., **1977**. An experimental study on the speciation of dissolved zinc, cadmium, lead and copper in river Rhine and North sea water, by differential pulsed anodic stripping voltammetry. *Marine Chemistry* 5, 207-228.
- Duncan, C., White, A.R., **2012**. Copper complexes as therapeutic agents. *Metallomics* 4, 127-138.
- Duran, A., Tuzen, M., Soylak, M., **2011**. Speciation of Cr(III) and Cr(VI) in geological and water samples by ytterbium(III) hydroxide coprecipitation system and atomic absorption spectrometry. *Food and Chemical Toxicology* 49, 1633-1637.

- Durán, I., Nieto, O., **2011**. Electrochemical speciation of dissolved Cu, Pb and Zn in an estuarine ecosystem (Ria de Vigo, NW Spain): Comparison between data treatment methods. *Talanta* 85, 1888-1896.
- Edward, J. T., **1998**. Partition coefficients of the iron (III) complexes of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogs and the correlation to iron chelation efficacy. Correction of some reported partition coefficients. *Biometals* 11, 203-205.
- Edward, J. T., Chubs, F. L., Sandster, J., **1997**. Iron chelators of the pyridoxal isonicotinoyl hydrazone class. Relationship of the lipophilicity of the apochelator to its ability to mobilize iron from reticulocytes in vitro: Reappraisal of reported partition coefficients. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 75, 1362-1368.
- Edward, J. T., Ponka, P., Richardson, D., R., **1995**. Partition coefficients of the iron(III) complexes of pyridoxal isonicotinoyl hydrazone and its analogs and the correlation to iron chelation efficacy. *Biometals* 8, 209-217.
- Ekino, S., Susa, M., Ninomiya, T., Imamura, K., Kitamura, T., **2007**. Minamata disease revisited: An update on the acute and chronic manifestations of methyl mercury poisoning. *Journal of the Neurological Sciences* 262, 131-144.
- Ellwood, M.J., Van den Berg, C.M.G., **2000**. Zinc speciation in the Northeastern Atlantic Ocean. *Marine Chemistry* 68, 295-306.
- Ellwood, M.J., Van den Berg, C.M.G., **2001**. Determination of organic complexation of cobalt in seawater by cathodic stripping voltammetry. *Marine Chemistry* 75, 33-47.
- ENIA, **2006**. (European Nickel Industry Association), Nickel Forum, http://www.enia.org/index.cfm/ci_id/12906/la_id/1.htm.
- Escudero, L.A., Martinez, L.D., Salonia, J.A., Gasquez, J.A., **2010**. Determination of Zn(II) in natural waters by ICP-OES with on-line preconcentration using a simple solid phase extraction system. *Microchemical Journal* 95, 164-168.
- Espada Bellido, E., **2010**. Diseño y optimización de nuevos sistemas de análisis de metales pesados en aguas mediante voltamperometría de redisolución adsorptiva y sensores ópticos. Tesis Doctoral, Universidad de Cádiz.
- Espada-Bellido, E., Galindo-Riaño, M.D., Aouarram, A., García-Vargas, M. **2009**. Applicability of 2-hydroxybenzaldehyde benzoylhydrazone in the determination of trace metals by adsorptive cathodic stripping voltammetry: Relevancy of simultaneous determinations. *Analytical Sciences* 25, 903-909.
- Ezoddin, M., Shemirani, F., Abdi, Kh., Khosravi, Saghezchi M., Jamali, M.R., **2010**. Application of modified nano-alumina as a solid phase extraction sorbent for the preconcentration of Cd and Pb in water and herbal samples prior to flame atomic absorption spectrometry determination. *Journal of Hazardous Materials* 178, 900-905.
- Faghihian, H., Hajishabani, A., Dadfarnia, S., Zamani, H., **2009**. Use of clinoptilolite loaded with 1-(2-pyridylazo)-2-naphthol as a sorbent for preconcentration of Pb(II), Ni(II), Cd(II) and Cu(II) prior to their determination by flame atomic absorption spectroscopy. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 89, 223-231.
- Fairbrother, A., Wenstel, R., Sappington, K., Wood, W., **2007**. Framework for Metals Risk Assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 68, 145-227.

- Fan, J., Wu, C., Wei, Y., Peng, C., Peng, P., **2007**. Preparation of xylenol orange functionalized silica gel as a selective solid phase extractor and its application for preconcentration-separation of mercury from waters. *Journal of Hazardous Materials* 145, 323-330.
- Faraji, M., Yamini, Y., Shariati, S., **2009**. Application of cotton as a solid phase extraction sorbent for online preconcentration of copper in water samples prior to inductively coupled plasma optical emission spectrometry determination. *Journal of Hazardous Materials* 166, 1383-1388.
- Farias, P.A.M., Ferreira, S.L.C., Ohara, A.K., Bastos, M.B., Gulart, M.S., **1992**. Adsorptive stripping voltammetric behaviour of copper complexes of some heterocyclic azo compounds. *Talanta* 39, 1245-1253.
- Fathi, S.A.M., Yaftian, M.R., **2009**. Enrichment of trace amounts of copper(II) ions in water samples using octadecyl silica disks modified by a Schiff base ionophore prior to flame atomic absorption spectrometric determination. *Journal of Hazardous Materials* 164, 133-137.
- Fattorusso, C., Campiani, G., Kukreja, G., Persico, M., Butini, S., Romano, M.P., Altarelli, M., Ros, S., Brindisi, M., Savini, L., Novellino, E., Nacci, V., Fattorusso, E., Parapini, S., Basilico, N., Taramelli, D., Yardley, V., Croft, S., Borriello, M., Gemma, S., **2008**. Design, synthesis, and structure-activity relationship studies of 4-quinoliny- and 9-acridinyldiazones as potent antimalarial agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 51, 1333-1343.
- Ferreira Domingos, R.I., **2006**. Trace metal speciation using thin layer techniques and stripping chronopotentiometry. Tesis Doctoral. Universidade do Algarve (Portugal).
- Ferreira, M., Caetano, M., Costa, J., Pousão-Ferreira, P., Vale, C., Reis-Henriques, M.A., **2008**. Metal accumulation and oxidative stress responses in, cultured and wild, white seabream from Northwest Atlantic. *Science of the Total Environment* 407, 638-646.
- Ferrer, A., **2003**. Intoxicación por metales. Anales del Sistema Sanitario de Navarra 26, 141-153.
- Fiehn, O., Jekel, M., **1997**. Analysis of phenolic compounds in industrial wastewater with high-performance liquid chromatography and post-column reaction detection. *Journal of Chromatography A* 769, 189-200.
- Fifield, F.W., Haines, P.J., **2000**. Environmental Analytical Chemistry. 2nd Ed. Blackwell Science, Oxford (England).
- Figueroa Preciado, G., **2003**. Optimización de una superficie de respuesta utilizando JMP IN. *Mosaicos Matemáticos* 11, 17-23.
- Firdaus, M.L., Norisuye, K., Sato, T., Urushihara, S., Nakagawa, Y., Umetani, S., Sohrin, Y., **2007**. Preconcentration of Zr, Hf, Nb, Ta and W in seawater using solid-phase extraction on TSK-8-hydroxyquinoline resin and determination by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 583, 296-302.
- Fischer, E., Van den Berg, C.M.G., **2001**. Determination of lead complexation in lake water by cathodic stripping voltammetry and ligand competition. *Analytica Chimica Acta* 432, 11-20.
- Fischer, J.C., Nganou, R., Wartel, M., **1984**. Etude de la capacite complexante des eaux de l'estuaire et de la baie de Seine. *Talanta* 1057-1061.
- Fleming, L.E., Broad, K., Clement, A., Dewailly, E., Elmir, S., Knap, A., Pomponi, S.A., Smith, S., Solo Gabriele, H., Walsh, P., **2006**. Oceans and human health: Emerging public health risks in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin* 53, 545-560.

- Fontanals, N., Marcé, R.M., Borrull, F., **2007**. New materials in sorptive extraction techniques for polar compounds. *Journal of Chromatography A* 1152, 14-31.
- Förstner, U., Wittmann, G.T.W., **1983**. Metal pollution in the aquatic environment. Second revised edition, Springer-Verlag, Berlin.
- Foster, P., **1976**. Concentrations and concentration factors of heavy metals in brown algae. *Environmental Pollution* 10, 45-53.
- Frankenberger, W.T., **2001**. Environmental Chemistry of Arsenic. Marcel Dekker, Nueva York, Estados Unidos.
- Fritz, J.S., Masso, J., **2001**. Miniaturized solid-phase extraction with resin disks. *Journal of Chromatography A* 909, 79-85.
- Galceran, J., Chito, D., Martínez-Micaelo, N., Companys, E., David, C., Puy, J., **2010**. The impact of high Zn⁰ concentrations on the application of AGNES to determine free Zn(II) concentration. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 638, 131-142.
- Galceran, J., Companys, E., Puy, J., Cecilia, J., Garces, J.L., **2004**. AGNES: a new electroanalytical technique for measuring free metal ion concentration, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 566, 95-109.
- Galceran, J., Huidobro, C., Companys, E., Alberti, G., **2007**. AGNES: A technique for determining the concentration of free metal ions. The case of Zn(II) in coastal Mediterranean seawater, *Talanta* 71, 1795-1803.
- Galindo, M.D., Jurado, J.A., García, M., González de Canales, M.L., Oliva, M., López, F., Granado, M.D., Espada, E., **2012**. Trace metal accumulation in tissues of sole (*Solea senegalensis*) and the relationships with the abiotic environment. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 92, 1072-1092.
- Gallego, M., Garcia-Vargas, M., Pino, F., Valcarcel, M., **1978**. Analytical applications of picolinealdehyde salicyloylhydrazone. Spectrophotometric determination of nickel and zinc. *Microchemical Journal* 23, 353-359.
- Gallego, M., Garcia-Vargas, M., Valcarcel, M., **1979**. Analytical applications of picolinealdehyde salicyloylhydrazone. II. Extraction and spectrophotometric determination of vanadium(V). *Microchemical Journal* 24, 143-149.
- Gallego, M., Garcia-Vargas, M., Valcárcel, M., **1982a**. Analytical applications of picolinealdehyde salicyloylhydrazone. III. Extraction and determination of zinc by atomic absorption spectrophotometry. *Microchemical Journal* 27, 328-338.
- Gallego, M., Valcárcel M., García-Vargas M., **1982b**. Spectrophotometric determination of zirconium with pyridoxal salicyloylhydrazone, *Analytica Chimica Acta* 138, 311-320.
- Gallego, M., Valcárcel, M., García-Vargas, M., **1983a**. Pyridoxal salicyloylhydrazone as a chromogenic reagent for the determination of titanium. *Microchimica Acta* 79, 289-297.
- Gallego, M., Valcárcel, M., García-Vargas, M., **1983b**. Spectrofluorimetric and spectrophotometric determination of aluminium with the salicyloylhydrazones of pyridine-2-aldehyde and pyridoxal. *Analyst* 108, 92-98.
- Ganjali, M.R., Basiripour, F., Salavati-Niasari, M., **2002a**. Determination of trace amounts of copper and lead in water, environmental and biological samples by atomic absorption spectrometry after their separation and

pre-concentration by using modified octadecyl silica membrane disks. *Canadian Journal of Analytical Sciences and Spectroscopy* 47, 41-48.

Ganjali, M.R., Ghasemi, Z., Salavati-Niasari, M., Haji-Agha Babaei, L., **2002b**. Solid phase extraction and flame atomic absorption determination of copper. *Chemia Analityczna* 47, 619-626.

Ganjali, M.R., Basiripour, F., Shamsipur, M., Hashemi, O.R., Moghimi, A., Aghabozorg, H., **2003**. Ultratrace determination of lead, cadmium and copper in environmental and biological samples by atomic absorption spectrometry after their separation and preconcentration using octadecyl silica membrane disks modified with a new N-S Schiff base. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 83, 997-1008.

Gao, X., Chen, C.T.A., **2012**. Heavy metal pollution status in surface sediments of the coastal Bohai Bay. *Water Research* 46, 1901-1911.

Garcés, J.L., Mas, F., Cecília, J., Galceran, J., Salvador, J., Puy, J., **1996**. Interpretation of speciation measurements on labile metal-macromolecular systems by voltammetric techniques, *Analyst* 121, 1855-1861.

García-Lestón, J., Roma-Torres, J., Vilares, M., Pinto, R., Prista, J., Teixeira, J.P., Mayan, O., Conde, J., Pingarilho, M., Gaspar, J.F., Pásaro, E., Méndez, J., Laffon, B., **2012**. Genotoxic effects of occupational exposure to lead and influence of polymorphisms in genes involved in lead toxicokinetics and in DNA repair. *Environment International* 43, 29-36.

Garcia-Vargas, M., Gallego, M., De La Guardia, M., **1980**. Pyridine-2-acetaldehyde salicyloylhydrazone as an analytical reagent and its application to the determination of vanadium. *The Analyst* 105, 965-973.

García-Vargas, M., Bautista, J.M., de Toro, P., **1981**. Analytical possibilities of pyridine-2-acetaldehyde benzoylhydrazone as a chromogenic reagent. *Microchemical Journal* 26, 557-568.

Garcia-Vargas, M., Rodriguez, J.M.B., Novás, S.A., Coy-Yll, R., **1982**. Absorptiometric determination of micro- and submicroamounts of iron using an extractive method with pyridine-2-acetaldehyde salicyloylhydrazone. *Microchemical Journal* 27, 519-529

García-Vargas, M., Hernandez-Artiga, M.P., Pérez-Bustamente, J.A., **1984**. Liquid-liquid extraction with 2-acetylpyridinebenzoylhydrazone in the determination of traces of copper, nickel, cobalt and zinc by atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 157, 363-367.

Gazda, D.B., Fritz, J.S., Porter, M.D., **2004**. Determination of nickel(II) as the nickel dimethylglyoxime complex using colorimetric solid phase extraction. *Analytica Chimica Acta* 508, 53-59.

Gelencsér, A., Kováts, N., Turóczy, B., Rostási, A., Hoffer, A., Imre, K., Nyirő-Kósa, I., Csákberényi-Malasics, D., Tóth, A., Czitrovsky, A., Nagy, A., Nagy, S., Ács, A., Kovács, A., Ferincz, A., Hartyáni, Z., Pósai, M., **2011**. The red mud accident in Ajka (Hungary): characterization and potential health effects of fugitive dust. *Environmental Science and Technology* 45, 1608-1615.

General Guidelines for Empore Extraction Cartridges: http://solutions.3m.com/wps/portal/3M/en_US/Empore/extraction/products/cartridges.

General Guidelines for Empore Extraction Disks: http://solutions.3m.com/wps/portal/3M/en_US/Empore/extraction/products/disks.

- Ghaedi, M., Ahmadi, F., Soylak, M., **2007**. Preconcentration and separation of nickel, copper and cobalt using solid phase extraction and their determination in some real samples. *Journal of Hazardous Materials* 147, 226-231.
- Ghanemi, K., Nikpour, Y., Omidvar, O., Maryamabadi, A., **2011**. Sulfur-nanoparticle-based method for separation and preconcentration of some heavy metals in marine samples prior to flame atomic absorption spectrometry determination. *Talanta* 85, 763-769.
- Ghiasvand, A.R., Ghaderi, R., Kakanejadifard, A., **2004**. Selective preconcentration of ultra trace copper(II) using octadecyl silica membrane disks modified by a recently synthesized glyoxime derivative. *Talanta* 62, 287-292.
- Gibbon-Walsh, K., Salaün, P., van den Berg, C.M.G., **2012**. Determination of arsenate in natural pH seawater using a manganese-coated gold microwire electrode. *Analytica Chimica Acta* 710, 50-57.
- Giusti, L., **1999**. Biologically available trace metals in *Mytilus edulis* from the coast of northeast England. *Environment International* 25, 969-981.
- Gladyshev, M.I., Gribovskaya, I.V., Moskvicheva, A.V., Muchkina, E.Y., Chuprov, S.M., Ivanova, E.A., **2001**. Content of metals in compartments of ecosystem of a Siberian pond. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 41, 157-162.
- González Benito, J., Jiménez Merino, M.T., Aznar Jiménez, A., **2002**. El problema de la toma de muestras en aguas. *Gestión Ambiental* 4, 7-14.
- González, D., Almendros, P., Álvarez, J.M., **2009**. Métodos de análisis de elementos en suelos: disponibilidad y fraccionamiento. *Anales de Química* 105, 205-212.
- Gonzalvez, A., Cervera, M.L., Armenta, S., de la Guardia, M., **2009**. A review of non-chromatographic methods for speciation analysis. *Analytica Chimica Acta* 636, 129-157.
- Granado Castro, M.D., **2005**. Metodología analítica de metales pesados en ecosistemas acuáticos. Estudio del impacto del desastre minero de Aznalcóllar en los niveles metálicos del estuario del Guadalquivir. Tesis Doctoral, Universidad de Cádiz.
- Granado-Castro, M. D., Galindo-Riaño, M. D., García-Vargas, M., **2004a**. Model experiments to test the use of a liquid membrane for separation and preconcentration of copper from natural water. *Analytica Chimica Acta* 506, 81-86.
- Granado-Castro, M. D., Galindo-Riaño, M. D., García-Vargas, M., **2004b**. Separation and preconcentration of cadmium ions in natural water using a liquid membrane system with 2-Acetylpyridine Benzoylhydrazone as carrier by flame atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B* 59, 577-583.
- Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K., **1983**. Methods of Seawater Analysis, 2ª Ed., Verlag Chemie, Weinheim, p.491.
- Greenaway, A.M., Rankine Jones, A.I., **1992**. Elemental concentrations in coastal sediments from Hellshire, Jamaica. *Marine Pollution Bulletin* 24, 390-397.
- Grosell, M., McDonald, M.D., Walsh, P.J., Wood, C.M., **2004**. Effects of prolonged exposure in the marine gulf toadfish (*Opsanus beta*) II: copper accumulation, drinking rate and Na⁺/K⁺-ATPase activity in osmoregulatory tissues. *Aquatic Toxicology* 68, 263-275.
- Guerra-García, J.M., Baeza-Rojano, E., Cabezas, M.P., Díaz-Pavón, J.J., Pacios, I., García-Gómez, J.C., **2009**.

The amphipods *Caprella penantis* and *Hyale schmidtii* as biomonitors of trace metal contamination in intertidal ecosystems of Algeciras Bay, Southern Spain. *Marine Pollution Bulletin* 58, 783-786.

Guerra-García, J.M., Ruiz-Tabares, A., Baeza-Rojano, E., Pilar Cabezas, M., Díaz-Pavón, J.J., Pacios, I., Maestre, M., Roi González, A., Espinosa, F., García-Gómez, J.C., **2010**. Trace metals in *Caprella* (Crustacea: Amphipoda). A new tool for monitoring pollution in coastal areas? *Ecological Indicators* 10, 734-743.

Guevara-Riba, A., Sahuquillo, A., Rubio, R., Rauret, G., **2005**. Effect of chloride on heavy metal mobility of harbour sediments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 382, 353-359.

Gustafsson, J.P., **2010**. Visual MINTEQ version 3.0. www.2lwr.kth.se/English/Oursoftware/vminteq/index.htm

Guthrie, J.W., Mandal, R., Salam, M.S.A., Hassan, N.M., Murimboh, J., Chakrabarti, C.L., Back, M.H., Grégoire, D.C., **2003**. Kinetic studies of nickel speciation in model solutions of a well-characterized humic acid using the competing ligand exchange method. *Analytica Chimica Acta* 480, 157-169.

Hashemi, P., Rahmani, Z., Kakanejadifard, A., Niknam, E., **2005**. Preparation of a fast-flow agarose-based chelating adsorbent with a novel dioxime derivative for selective column preconcentration of copper. *Analytical Sciences* 21, 1297-1301.

Hasle, J.R., Abdullah, M.I., **1981**. Analytical fractionation of dissolved copper, lead and cadmium in coastal seawater. *Marine Chemistry* 10, 487-503.

Hatje, V., Apte, S.C., Hales, L.T., Birch, G.F., **2003**. Dissolved trace metal distributions in Port Jackson estuary (Sydney Harbour), Australia. *Marine Pollution Bulletin* 46, 719-730.

Heimbürger, L.E., Cossa, D., Thibodeau, B., Khripounoff, A., Mas, V., Chiffoleau, J.F., Schmidt, S., Migon, C., **2012**. Natural and anthropogenic trace metals in sediments of the Ligurian Sea (Northwestern Mediterranean). *Chemical Geology* 291, 141-151.

Henke, K.R., **2009**. Arsenic. Environmental Chemistry, Health Threats and Waste Treatment. Ed. John Wiley & Sons, Chichester (England).

Herndon, V., Flowery Branch, G., **1999**. MINTEQA2/PRODEFA2, A Geochemical Assessment Model for Environmental Systems: Version 4.0 User Manual Supplement, Environmental Protection Agency, National Exposure Research Laboratory, Ecosystems Research Division, Athens, Georgia.

Hill, A.A., Lipert, R.J., Porter, M.D., **2010**. Determination of colloidal and dissolved silver in water samples using colorimetric solid-phase extraction. *Talanta* 80, 1606-1610.

Hirose, K., **2006**. Chemical speciation of trace metals in seawater: a review. *Analytical Sciences* 22, 1055-1063.

Hlavay, J., Prohaska, T., Weisz, M., Wenzel, W.W., Stingeder, G.J., **2004**. Determination of trace elements bound to soils and sediment fractions (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry* 76(2), 415-442.

http://solutions.3m.com/wps/portal/3M/en_US/Empore/extraction/center/technology/

http://spanish.news.cn/tec/2012-01/30/c_131383091.htm

<http://www.epa.gov/safewater/contaminants/index.html>

<http://www.telegraph.co.uk/earth/environment/9053671/20-tons-of-cadmium-poisoning-vital-Chinese-river.html>

- Huang, C., Hu, B., **2008**. Silica-coated magnetic nanoparticles modified with γ -mercaptopropyl trimethoxysilane for fast and selective solid phase extraction of trace amounts of Cd, Cu, Hg, and Pb in environmental and biological samples prior to their determination by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy* 63, 437-444.
- Huidobro, C., Companys, E., Puy, J., Galceran, J., Pinheiro, J.P., **2007**. The use of microelectrodes with AGNES. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 606, 134-140.
- Hurst, M.P., Bruland, K.W., **2005**. The use of Nafion-coated thin mercury film electrodes for the determination of the dissolved copper speciation in estuarine water. *Analytica Chimica Acta* 546, 68-78.
- Ianni, C., Bignasca, A., Magi, E., Rivaró, P., **2010**. Metal bioavailability in marine sediments measured by chemical extraction and enzymatic mobilization. *Microchemical Journal* 96, 308-316.
- Imamoglu, M., Gunes, V., **2008**. Column solid phase extraction of copper and nickel on triethylenetetramine bonded silica gel for their atomic absorption spectrometric determination. *Instrumentation Science & Technology* 36, 105-116.
- Inaba, T., Kobayashi, E., Suwazono, Y., Uetani, M., Oishi, M., Nakagawa, H., Nogawa, K., **2005**. Estimation of cumulative cadmium intake causing Itai-itai disease. *Toxicology Letters* 159, 192-201.
- Irigoyen, L., Moreno, C., Mendiguchía, C., García-Vargas, M., **2006**. Application of liquid membranes to sample preconcentration for the spectrometric determination of cadmium in seawater. *Journal of Membrane Science* 274, 169-172.
- ISO, Soil Quality, **1994**. Extraction of trace metals soluble in aqua regia. Ed. International Organization of Standardization, vol. ISO-11466.
- Issiki, K., Sohrin, Y., Karatini, H., Nakayama, K., **1989**. Preconcentration of chromium(III) and chromium(VI) in seawater by complexation with quinolin-8-ol and adsorption on macroporous resin. *Analytica Chimica Acta* 224, 55-64.
- Itoh, A., Ishigaki, T., Arakaki, T., Yamada, A., Yamaguchi, M., Kabe, N., **2009**. Determination of trace metals in coastal seawater around Okinawa and its multielement profiling analysis. *Bunseki Kagaku* 58, 257-263.
- IUPAC. **1997**. McNaught, A.D., Wilkinson, A. Compendium of Chemical Terminology, 2^a Ed. (the "Gold Book"). Oxford. Blackwell Scientific Publications.
- Jagner, D., Arén, K., **1978**. Derivative potentiometric stripping analysis with a thin film of mercury on a glassy carbon electrode. *Analytica Chimica Acta* 100, 375-388.
- Jain, C.K., Ali, I., **2000**. Arsenic: Occurrence, toxicity and speciation techniques. *Water Research* 34, 4304-4312.
- Jakuba, R.W., Moffett, J.W., Saito, M.A., **2008**. Use of a modified, high-sensitivity, anodic stripping voltammetry method for determination of zinc speciation in the North Atlantic Ocean. *Analytica Chimica Acta* 614, 143-152.
- Jan, S., Waqar, F., Khan, S.A., **2007**. Extraction of traces of chromium, copper and lead from water using fluorinated β -diketone immobilized on styrene-divinylbenzene as chelating resin. *Journal of the Chemical Society of Pakistan* 29, 476-480.
- Jančula, D., Maršálek, B., **2011**. Critical review of actually available chemical compounds for prevention and management of cyanobacterial blooms. *Chemosphere* 85, 1415-1422.

- Jia, X., Han, Y., Liu, X., Duan, T., Chen, H., **2011**. Speciation of mercury in water samples by dispersive liquid-liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 66, 88-92.
- Jiang, Z-T., Yu, J.C., Liu, H-Y., **2005**. Simultaneous determination of cobalt, copper and zinc by energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry after preconcentration on PAR-loaded ion-exchange resin. *Analytical Sciences* 21, 851-854.
- Jin, L., Gogan, N.J., **2000**. Copper complexing capacities of freshwaters by adsorptive cathodic stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta* 412, 77-88.
- Job, P., **1928**. Formation and stability of inorganic complexes in solution. *Annales de Chimie* 9, 113-203.
- Jonas, P.J.C., Millward, G.E., **2010**. Metals and nutrients in the Severn Estuary and Bristol Channel: Contemporary inputs and distributions. *Marine Pollution Bulletin* 61, 52-67.
- Jorge, E.O., Rocha, M.M., Fonseca, I.T.E., Neto, M.M.M., **2010**. Studies on the stripping voltammetric determination and speciation of chromium at a rotating-disc bismuth film electrode. *Talanta* 81, 556-564.
- Joseph, J., Nagashri, K., Janaki, G.B., **2012**. Novel metal based anti-tuberculosis agent: Synthesis, characterization, catalytic and pharmacological activities of copper complexes. *European Journal of Medicinal Chemistry* 49, 151-163.
- Jouanneau, J.M., Latouche, C., Pautrizel, F., **1983**. Critical analysis of sequential extractions by the study of several constituents of extraction residues. *Environmental Technology Letters* 4(12), 509-514.
- Jung, H.-B., Yun, S.-T., Kwon, J.-S., Zheng, Y., **2012**. Role of iron colloids in copper speciation during neutralization in a coastal acid mine drainage, South Korea: Insight from voltammetric analyses and surface complexation modelling. *Journal of Geochemical Exploration* 112, 244-251.
- Kabata-Pendias, A., **2000**. Trace elements in soils and plants. 3rd Ed. CRC Press, United States of America.
- Kara, D., Tekin, N., **2005**. Solid-phase extraction and spectrophotometric determination of trace amounts of mercury in natural samples. *Microchimica Acta* 149, 193-198.
- Karadede, H., Ünlü, E., **2000**. Concentrations of some heavy metals in water, sediment and fish species from the Atatürk Dam Lake (Euphrates), Turkey. *Chemosphere* 41, 1371-1376.
- Karlberg, A.T., Share, L., Lindberg, I., Nyhammar, E., **1998**. A method for quantification of formaldehyde in the presence of formaldehyde donors in skin-care products. *Contact Dermatitis* 38, 20-28.
- Karve M., Rajgor R.V., **2009**. Octadecyl bonded silica membrane disk modified with Cyanex302 for separation and flame atomic absorption spectrometric determination of nickel from tap water and industrial effluent. *Journal of Hazardous Materials* 166, 576-580.
- Kasprzak, K., S., Bal, W., Karaczyn, A., A., **2003**. The role of chromatin damage in nickel-induced carcinogenesis. A review of recent developments. *Journal of Environmental Monitoring* 5, 183-187.
- Kašuba, V., Rozgaj, R., Milić, M., Želježić, D., Kopjar, N., Pizent, A., Kljaković-Gašpić Z. **2010**. Evaluation of lead exposure in battery-manufacturing workers with focus on different biomarkers. *Journal of Applied Toxicology* 30, 321-3288.
- Katarina, R.K., Takayanagi, T., Oshita, K., Oshima, M., Motomizu, S., **2008**. Sample pretreatment using chitosan-based chelating resin for the determination of trace metals in seawater samples by inductively

- coupled plasma-mass spectrometry. *Analytical Sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry* 24, 1537-1544.
- Katyal, M., Dutt, Y., **1975**. Analytical applications of hydrazones. *Talanta* 22, 151-166.
- Kennish, M.J., **1986**. Ecology of Estuaries, Vol. I: Physical and Chemical Aspects. Ed. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
- Kennish, M.J., **1996**. Practical handbook of estuarine and marine pollution. Ed. CRC Press, New York.
- Khezami, L., Capart, R., **2005**. Removal of chromium(VI) from aqueous solution by activated carbons: kinetic and equilibrium studies. *Journal of Hazardous Materials* 123, 223-231.
- Kim, H.J., Khalimonchuk, O., Smith, P.M., Winge, D.R., **2012**. Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1823, 1604-1616.
- Kim, J.H., Gibb, H.J., Howe, P.D., **2006**. Cobalt and inorganic cobalt compounds, World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- Kimbrough, D.E., Cohen, Y., Winer, A.M., Creelman, L., Mabuni, C.A., **1999**. A critical assessment of chromium in the environment. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 29, 1-46.
- Kirkbright, G.F., West, T.S., Woodward, C., **1965**. Spectrofluorometric determination of submicrogram amounts of aluminum and beryllium with 2-hydroxy-3-naphthoic acid. *Analytical Chemistry* 37, 137-143.
- Kleindienst, T.E., Corse, E.W., Blandchard, F.T., Lonneman, W.A., **1998**. Evaluation of the performance of DNPH-coated silica gel and C₁₈ cartridges in the measurement of formaldehyde in the presence and absence of ozone. *Environmental Science and Technology* 32, 124-130.
- Komjarova, I., Blust, R., **2006**. Comparison of liquid-liquid extraction, solid-phase extraction and coprecipitation preconcentration methods for the determination of cadmium, copper, nickel, lead and zinc in seawater. *Analytica Chimica Acta* 576, 221-228.
- Koutecký, J., Koryta, J., **1961**. The general theory of polarographic kinetic currents. *Electrochimica Acta* 3, 318-339.
- Kraus, U. Wiegand, J., **2006**. Long-term effects of the Aznalcóllar mine spill—heavy metal content and mobility in soils and sediments of the Guadiamar river valley (SW Spain). *Science of The Total Environment* 367, 855-871.
- Kuijper, M. W. M., **2003**. Marine and coastal environmental awareness building within the context of UNESCO's activities in Asia and the Pacific. *Marine Pollution Bulletin* 47, 265-272.
- Laglera, L.M., Battaglia, G., Van den Berg, C.M.G., **2007**. Determination of humic substances in natural waters by cathodic stripping voltammetry of their complexes with iron. *Analytica Chimica Acta* 599, 58-66.
- Langston, W.J., Spence, S.K., **1995**. Biological factors involved in metal concentrations observed in aquatic organisms. In: Tessier, A., Turner, D.R. (Eds.), Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems. John Wiley and Son, West Sussex, UK, pp. 407-478.
- Larner, B.L., Palmer, A.S., Seen, A.J., Townsend, A.T., **2008**. A comparison of an optimised sequential extraction procedure and dilute acid leaching of elements in anoxic sediments, including the effects of oxidation on sediment metal partitioning, *Analytica Chimica Acta* 608 147-157.

- Lauer, M.M., Bento de Olivera, C., Inocencio Yano, N.L., Bianchini, A., **2012**. Copper effects on key metabolic enzymes and mitochondrial membrane potential in gills of the estuarine crab *Neohelice granulata* at different salinities. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 156, 140-147.
- Leleyter, L., Rousseau, C., Biree, L., Baraud, F., **2012**. Comparison of EDTA, HCl and sequential extraction procedures, for selected metals (Cu, Mn, Pb, Zn), in soils, riverine and marine sediments. *Journal of Geochemical Exploration* 116-117, 51-59.
- Li, S., Meizhou, G., **2006**. Determination of trace copper, nickel and cobalt in sea water by flame atomic absorption spectrometry after preconcentration with polyvinyl chloride-polyethylene polyamine resin. *Fenxi Ceshi Xuebao* 25, 96-98.
- Li, Y., Xue, H., **2001**. Determination of Cr(III) and Cr(VI) species in natural waters by catalytic cathodic stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta* 448, 121-134.
- Liang, P., Liu, Y., Guo, L., **2005**. Determination of trace rare earth elements by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry after preconcentration with multiwalled carbon nanotubes. *Spectrochimica Acta, Part B: Atomic Spectroscopy* 60, 125-129.
- Lindahl, R., Levin, J.O., Martensson, M., **1996**. Validation of a diffusive sampler for the determination of acetaldehyde in air. *Analyst* 121, 1177-1181.
- Lindroos, A., J., Derome, J., Nikonov, V., Niska, Kaarina., **1996**. Influence of sulphur and heavy metal emissions from Monchegorsk, Northwest Russia, on percolation water quality in Pinus sylvestris stands. *Scandinavian Journal of Forest Research* 11, (1-4), 97 – 103.
- Lindsay, W.L., Norvell, W.A., **1978**. Development of a DPTA soil test for zinc, iron, manganese and copper, *Soil Science Society of American Journal* 42, 421-428.
- Lingeman, H., Hoekstra-Oussoren, S. J. F., **1997**. Particle-loaded membranes for sample concentration and/or cleanup in bioanalysis. *Journal of Chromatography B* 689, 221-237.
- Linnaeus, C. **1758**. Tomus I. Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Editio decima, reformata. Holmiae. (Laurentii Salvii), [1-4], 1-824.
- Llop, S., Porta, M., Martinez, M.D., Aguinagalde, X., Fernández, M.F., Fernández-Somoano, A., Casas, M., Vrijheid, M., Ayerdi, M., Tardón, A. Ballester, F., **2012**. Estudio de la evolución de la exposición a plomo en la población infantil española en los últimos 20 años. ¿Un ejemplo no reconocido de «salud en todas las políticas»? *Gaceta Sanitaria*, In press.
- Loska, K., Cebula, J., Pelczar, J., Wiechula, D., Kwapulinski, J., **1997**. Use of enrichment, and contamination factors together with geoaccumulation indexes to evaluate the content of Cd, Cu, and Ni in the Rybnik water Reservoir in Poland. *Water, Air and Soil Pollution* 93, 347–365.
- Louis, Y., Garnier, C., Lenoble, V., Mounier, S., Cukrov, N., Omanović, D., Pižeta, I., **2009**. Kinetic and equilibrium studies of copper-dissolved organic matter complexation in water column of the stratified Krka River estuary (Croatia). *Marine Chemistry* 114, 110-119.
- Lovric, M., **2010**. Stripping Voltammetry; en Sholz, F., *Electroanalytical Methods: Guide to experiments and applications*, 2nd Ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

- Lu, Y.H., Lu, Y.W., Wu, C.L., Shao, Q., Chen, X.L., Biboum Bimbong, R.N., **2006**. UV-visible spectroscopic study of the salicylaldehyde benzoylhydrazone and its cobalt complexes. *Spectrochimica Acta Part A* 65, 695-701.
- Luoma, S.N., Bryan, J.W., **1978**. A statistical assessment of the form of trace metals in oxidized estuarine sediments employing chemical extractants. *Science of the Total Environment* 17, 165-196.
- Macrellis, H. M., Trick, C. G., Rue, E., Smith, G., Bruland, K., W., **2001**. Collection and detection of natural iron-binding ligands from seawater. *Marine. Chemistry* 76, 175-187.
- Magnier, A., Billon, G., Louis, Y., Baeyens, W., Elskens, M., **2011**. On the lability of dissolved Cu, Pb and Zn in freshwater: Optimization and application to the Deûle (France). *Talanta* 86, 91-98.
- Maheswari, M.A., Subramanian, M. S., **2005**. New multidentate ion-selective grafted polymer for preconcentration of lanthanides and actinides. *Analytical Letters* 38, 1331-1349.
- Mahmoud, M.E., Osman, M.M., Hafez, O.F., Hegazi, A.H., Elmelegy, E., **2010**. Removal and preconcentration of lead (II) and other heavy metals from water by alumina adsorbents developed by surface-adsorbed-dithizone. *Desalination* 251, 123-130.
- Mahmoud, M.E., Yakout, A.A., Ahmed, S.B., Osman, M., **2008a**. Speciation, selective extraction and preconcentration of chromium ions via alumina-functionalized-isatin-thiosemicarbazone. *Journal of Hazardous Materials* 158, 541-548.
- Mahmoud, M.E., Yakout, A.A., Ahmed, S.B., Osman, M., **2008b**. Development of a method for chromium speciation by selective solid phase extraction and preconcentration on alumina functionalized with thiosemicarbazide. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 31, 2475.
- Manahan, S.E., **2010**. Environmental chemistry, 9th Ed., CRC Press, United States of America.
- Manivannan, D., Biju, V.M., **2011**. Determination of toxic heavy metals in sea water by FAAS after preconcentration with a novel chelating resin. *Water Science and Technology* 64, 803-808.
- Martín-Díaz, M.L., Riba, I., Casado-Martínez, M.C., Del Valls, A., **2006**. Biodisponibilidad de metales en sedimentos de estuarios españoles utilizando Carcinus maenas bioavailability of metals in sediments from Spanish estuarios using Carcinus maenas. *Ciencias Marinas* 32, 412-420.
- Martorell, I., Perello, G., Martí-Cid, R., Llobet, J.M., Castell, V., Domingo, J.L., **2011**. Human exposure to arsenic, cadmium, mercury, and lead from foods in Catalonia, Spain: temporal trend. *Biological Trace Element Research* 142, 309-22.
- Mashhadizadeh, M.H., Azimi, M.S., Pesteh, M., Sheikhshoei, I., Ardakani, M.M., Karimi, M. A., **2008a**. Flame atomic absorption spectrometric determination of µg amounts of Fe (III) ions after solid phase extraction using modified octadecyl silica membrane disks. *Spectrochimica Acta Part B* 63, 889-892.
- Mashhadizadeh, M.H., Pesteh, M., Talakesh, M., Sheikhshoei, I., Ardakani, M.M., Karimi, M.A., **2008b**. Solid phase extraction of copper (II) by sorption on octadecyl silica membrane disk modified with a new Schiff base and determination with atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B* 63, 885-888.
- Mashhadizadeh, M.H., Zadmehr, M.R., Allah-Abadi, H., **2006**. Selective preconcentration and solid phase extraction of ultra trace copper(II) from natural water and human hair and determination by atomic absorption spectroscopy. *Asian Journal of Chemistry* 18, 137-144.
- Mendil, D., Tuzen, M., Usta, C., Soylak, M., **2008**. Bacillus thuringiensis var. israelensis immobilized on

Chromosorb 101: A new solid phase extractant for preconcentration of heavy metal ions in environmental samples. *Journal of Hazardous Materials* 150, 357-363.

Metwally, K.A., Abdel-Aziz, L.M., Lashine, E.M., Hussein, M.I. and Badawy R.H., **2006**. Hydrazones of 2-aryl-quinoline-4-carboxylic acid hydrazides: synthesis and preliminary evaluation as antimicrobial agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 14, 8675-8682.

Millar L.A., Bruland K.W., **1997**. Competitive equilibration techniques for determining transition metal speciation in natural waters: Evaluation using model data. *Analytica Chimica Acta* 343, 161-181.

Miller, J.N., Miller, J.C., **2002**. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4ª Edición. Madrid. Pearson Educación.

Millward, G.E., Kitts, H.J., Ebdon, L., Allen, J.I., Morris, A.W., **1997a**. Arsenic in the Thames Plume, UK. *Marine Environmental Research* 44, 51-67.

Millward, G.E., Kitts, H.J., Ebdon, L., Allen, J.I., Morris, A.W., **1997b**. Arsenic species in the Humber Plume, U.K. *Continental Shelf Research* 17, 435-454.

Mirzaei, M., Behzadi, M., Mahmoud Abadi, N., Beizaei, A., **2011**. Simultaneous separation/preconcentration of ultra trace heavy metals in industrial wastewaters by dispersive liquid-liquid microextraction based on solidification of floating organic drop prior to determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Journal of Hazardous Materials* 186, 1739-1743.

Mladenova, E., Dakova, I., Karadjova, I., Karadjov, M., **2012**. Column solid phase extraction and determination of ultra-trace Au, Pd and Pt in environmental and geological samples. *Microchemical Journal* 101, 59-64.

Moghim, A., **2007a**. Solid phase extraction of trace copper(II) using octadecyl silica membrane disks modified with N,N'-disalicylideneethylenediamine, *Chinese Journal of Chemistry* 25, 1842-1848.

Moghim, A., **2007b**. Preconcentration and determination of copper(II) using octadecyl silica membrane disks modified by 1,5-diphenylcarbazide and flame atomic absorption spectrometry. *Chinese Journal of Chemistry* 25, 1663-1668.

Moghim, A., Poursharifi, M.J., **2009**. Selective pre-concentration and solid phase extraction of trace amounts of copper(II) in aqueous samples using octadecyl silica membrane disks. *Asian Journal of Chemistry* 21, 2541-2548.

Mohammad, B., Ure, A.M., Reglinski, J., Littlejohn, D., **1990**. Speciation of antimony in natural waters: the determination of Sb(III) and Sb(V) by continuous flow hydride generation-atomic absorption spectrometry. *Chemical Speciation and Bioavailability* 33, 117-122.

Mohan, D., Pittman Jr, C.U., **2006**. Activated carbons and low cost adsorbents for remediation of tri- and hexavalent chromium from water. *Journal of Hazardous Materials B* 137, 762-811.

Mohan, D., Singh, K.P., Singh, V.K., **2005**. Removal of hexavalent chromium from aqueous solution using low-cost activated carbons derived from agricultural waste materials and activated carbon fabric cloth. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 44, 1027-1042.

Mohan, D., Singh, K.P., Singh, V.K., **2006**. Trivalent chromium removal from wastewater using low cost activated carbon derived from agricultural waste material and activated carbon fabric cloth, *Journal of Hazardous Materials* 135, 280-295.

- Mohan, M., Gupta, N., K., Kumar, M., Jha, N., K., Antholine, W., E., **1992**. Synthesis, magnetic and electrochemical properties of binuclear copper(II) complexes of pyridoxal hydrazones. *Inorganica Chimica Acta* 197, 39-46.
- Moldovan, C.M., Oniga, O., Pârvu, A., Tipericiuc, B., Verite, P., Pîrnău, A., Crișan, O., Bojiță, M., Pop, R., **2011**. Synthesis and anti-inflammatory evaluation of some new acyl-hydrazones bearing 2-aryl-thiazole. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46, 526-534.
- Mollaei, K., Mashhadizadeh, M.H., **2005**. Solid phase extraction and preconcentration of copper (II) using a thia-crown-ether modified octadecyl silica membrane disk. *Asian Journal of Chemistry* 17, 1390-1396.
- Money, C., Braungardt C.B., Jha, A.N., Worsfold, P.J., Achterberg, E.P., **2011**. Metal speciation and toxicity of Tamar Estuary water to larvae of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Marine Environmental Research* 72, 3-12.
- Monticelli, D., Dossi, C., Castelletti, A., **2010**. Assessment of accuracy and precision in speciation analysis by competitive ligand equilibration–cathodic stripping voltammetry (CLE–CSV) and application to Antarctic samples. *Analytica Chimica Acta* 675, 116–124.
- Morales-Caselles, C., Kalman, J., Riba, I., DelValls, T.A., **2007**. Comparing sediment quality in Spanish littoral areas affected by acute (Prestige, 2002) and chronic (Bay of Algeciras) oil spills. *Environmental pollution* 146, 233-240.
- Morales-Caselles, C., Riba, I., Sarasquete, C., DelValls, T.A., **2008**. The application of a weight of evidence approach to compare the quality of coastal sediments affected by acute (Prestige, 2002) and chronic (Bay of Algeciras) oil spills. *Environmental pollution* 156, 394-402.
- Morel, F.M.M., **1983**. Principles of Aquatic Chemistry. Wiley-Interscience, New York.
- Moreton, B.M., Fernandez, J-M., Dolbecq, M.B.D., **2009**. Development of a field preconcentration/elution unit for routine determination of dissolved metal concentrations by ICP-OES in marine waters: application for monitoring of the New Caledonia lagoon. *Geostandards and Geoanalytical Research* 33, 205-218.
- Moriarty, F., **1999**. Ecotoxicology. The Study of Pollutants in Ecosystems. Academic Press, London.
- Morillo, J., Usero, J., **2008**. Trace metal bioavailability in the waters of two different habitats in Spain: Huelva estuary and Algeciras Bay. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 851-859.
- Morillo, J., Usero, J., Gracia, I., **2007**. Potential mobility of metals in polluted coastal sediments in two Bays of southern Spain, *Journal of Coastal Research* 23, 352–361.
- Mota, A.M., Pinheiro, J.P., Simões Gonçalves, M.L., **2012**. Electrochemical methods for speciation of trace elements in marine waters. dynamic aspects. *The Journal of Physical Chemistry A* 116, 6433-6442.
- Muñoz, O., Devesa, V., Suñer, M.A., Vélez, D., Montoro, R., Urieta, I., Macho, M.L., Jalón, M., **2000**. Total and inorganic arsenic in fresh and processed fish products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 4369-4376.
- Murata, K., Sakamoto, M., **2011**. Minamata Disease. *Encyclopedia of Environmental Health* 3, 774-780.
- Murimboh, J., Lam, M.T., Hassan, N.M., Chakrabarti, C.L., **2000**. A study of Nafion-coated and uncoated thin mercury film-rotating disk electrodes for cadmium and lead speciation in model solutions of fulvic acid. *Analytica Chimica Acta* 423, 115-126.
- Muse, J.O., Carducci, C.N., Stripeikis, J.D., Tudino, M.B., Fernández, F.M., **2006**. A link between lead and

- cadmium kinetic speciation in seawater and accumulation by the green alga *Ulva lactuca*. *Environmental Pollution* 141, 126-130.
- Mzimela, H.M., Wepener, V., Cyrus, D.P., **2003**. Seasonal variation of selected metals in sediments, water and tissues of the groovy Mollet, *Liza dumerelli* (Mugilidae) from the Mhlathuze Estuary, South Africa. *Marine Pollution Bulletin* 46, 659-676.
- Nakagawa, Y., Firdaus, M.L., Norisuye, K., Sohrin, Y., Irisawa, K., Hirata, T., **2008**. Precise isotopic analysis of Mo in seawater using multiple collector-inductively coupled mass spectrometry coupled with a chelating resin column preconcentration. *Analytical Chemistry* 80, 9213-9219.
- Namiesnik, J., Szefer, P., **2010**. Analytical Measurements in Aquatic Environments. Taylor & Francis Group.
- Nason, J.A., Sprick, M.S., Bloomquist, D.J., **2012**. Determination of copper speciation in highway stormwater runoff using competitive ligand exchange-adsorptive cathodic stripping voltammetry. *Water Research* 46, 5788-5798.
- Niaz Asadullah, M., Chaudhury, N., **2011**. Poisoning the mind: Arsenic contamination of drinking water wells and children's educational achievement in rural Bangladesh. *Economics of Education Review* 30, 873-888.
- Niedzielski, P., Siepak, J., Kowaleczuk, Z., **1999**. Speciation analysis of arsenic, antimony and selenium in the Surface Waters of Poznań. *Polish Journal of Environmental Studies* 8, 183-187.
- Nimmo, M., Fones, G.R., **1997**. The potential pool of Co, Ni, Cu, Pb and Cd organic complexing ligands in coastal and urban rain waters. *Atmospheric Environment* 31, 693-702.
- Nimmo, M., Fones, G.R., Chester, R., **1998**. Atmospheric deposition: a potential source of trace metal organic complexing ligands to the marine environment. *Croatica Chemica Acta* 71, 323-341.
- Níquel, **2006**. Enciclopedia Libre Universal en Español, 2006. <http://enciclopedia.us.es/index.php/N%EDquel>.
- Nirel, P.M.V., Morel, F.M.M., **1990**. Pitfalls of sequential extractions. *Water Research* 24(8), 1055-1056.
- Nobi, E.P., Dilipan, E., Thangaradjou, T., Sivakumar, K., Kannan, L., **2010**. Geochemical and geo-statistical assessment of heavy metal concentration in the sediments of different coastal ecosystems of Andaman Islands, India. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 87, 253-264.
- Noel, S., Buffle, J., Fatin-Rouge, N., Labille, J., **2006**. Factors affecting the flux of macromolecular, labile, metal complexes at consuming interfaces, in water and inside agarose gel: SSCP study and environmental implications. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 595, 125-135.
- Nogawa, K., Suwazono, Y., **2011**. Itai-Itai Disease, Encyclopedia of Environmental Health, 308-314.
- Nordberg, M., Templeton, D.M., Andersen, O., Duffus, J.H., **2009**. Glossary of terms used in ecotoxicology (IUPAC Recomendatio 2009). *Pure and Applied Chemistry* 81(5), 829-970.
- Nowack, B.J.M., **2005**. Biogeochemistry of chelating agents. Vanbriesen. ACS Symposium Series, Oxford University Press, New York.
- Nriagu, J., O., Pacyna, J. M., **1988**. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soils by trace metals. *Nature* 333, 134-139.
- O'Connor, R.J., Li, Q., Stephens, W.E., Hammond, D., Elton-Marshall, T., Cummings, K.M., Giovino, G.A., Fong, G.T., **2010**. Cigarettes sold in China: design, emissions and metals. *Tobacco control* 19, 47-53.

- Okumura, M., Fujinaga, K., Seike, Y., **2005**. Design of in situ solid-phase extraction for a simple and rapid preconcentration of trace chemical species for field work and its application to the speciation of environmental water samples. *Bunseki Kagaku* 54, 1061-1073.
- Olías, M., Moral, F., Galván, L., Cerón, J.C., **2012**. Groundwater contamination evolution in the Guadiamar and Agrio aquifers after the Aznalcóllar spill: assessment and environmental implications. *Environmental monitoring and assessment* 184, 3629-3641.
- Olmstead, M.L., Nicholson, R.S., **1968**. Influence of double-layer charging in chronopotentiometry. *Journal of Physical Chemistry* 72, 1650-1656.
- Omanović, D., Garnier, C., Louis, Y., Lenoble, V., Mounier, S., Pižeta, I., **2010**. Significance of data treatment and experimental setup on the determination of copper complexing parameters by anodic stripping voltammetry. *Analytica Chimica Acta* 664, 136-143.
- Ontiveros, D., Márquez-Ferrando, R., Fernández-Cardenete, J.R., Santos, X., Caro, J., Pleguezuelos, J.M., **2012**. Recovery of the bird community after a mine spill and landscape restoration of a Mediterranean river. *Restoration Ecology*, In press.
- Oremland, R.S., Stolz, J.F., **2003**. The ecology of arsenic. *Science* 300, 939-944.
- Orozco-Barrenetxea, C., Pérez-Serrano, A., González-Delgado, M.N., Rodríguez-Vidal, F.J., Alfayate-Blanco, J.M., **2008**. Contaminación ambiental. Una visión desde la Química, 1ª Edición, 5ª reimpresión. International Thomson Editores, Paraninfo, Madrid (España).
- OSPAR Comisión, **2009**. Background Document on CEMP Assessment Criteria for QSR 2010.
- Otero-Romaní, J., Moreda-Piñeiro, A., Bermejo-Barrera, P., **2011**. Trace metals distribution in surface and deep seawater from the Ría de Arousa estuary (north-western Spain). Study before and after the Prestige oil tanker sinking. *Microchemical Journal* 97, 122-130.
- Öztürk, M., Bizsel, N., Steinnes, E., **2003**. Iron speciation in eutrophic and oligotrophic Mediterranean coastal waters, impact of phytoplankton and protozoan blooms on iron distribution. *Marine Chemistry* 81, 19-36.
- Pacyna, E., G., Pacyna, J., M., **2001**. An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide. *Environmental Reviews* 9, 269-298.
- Pacyna, J., M., Ottar, B., **1985**. Transport and chemical composition of the summer aerosol in the Norwegian Arctic. *Atmospheric Environment* 19, 2109-2120.
- Pan, K., Wang, W-X., **2012**. Trace metal contamination in estuarine and coastal environments in China. *Science of the Total Environment* 421-422, 3-16.
- Panahi, H.A., Mottaghinejad, E., Badr, A.R., Moniri, E., **2011**. Synthesis, characterization, and application of amberlite XAD-2-salicylic acid- iminodiacetic acid for lead removal from human plasma and environmental samples. *Journal of Applied Polymer Science* 121, 1127-1136.
- Parat, C., Aguilar, D., Authier, L., Potin-Gautier, M., Companys, E., Puy, J., Galceran, J., **2011a**. Determination of Free Metal Ion Concentrations Using Screen-Printed Electrodes and AGNES with the Charge as Response Function. *Electroanalysis* 23, 619-627.
- Parat, C., Authier, L., Aguilar, D., Companys, E., Puy, J., Galceran, J., Potin-Gautier, M., **2011b**. Direct

determination of free metal concentration by implementing stripping chronopotentiometry as the second stage of AGNES. *Analyst* 136, 4337-4343.

Parat, C., Schneider, A., Castetbon, A., Potin-Gautier, M., **2011c**. Determination of trace metal speciation parameters by using screen-printed electrodes in stripping chronopotentiometry without deaerating. *Analytica Chimica Acta* 688, 156-162.

Patterson, C.C., Settle, D.M., **1976**. The reduction of orders of magnitude errors in lead analyses of biological materials and natural waters by evaluating and controlling the extent and sources of industrial lead contamination introduced during sample collecting, handling and analysis. *Accuracy in Trace Analysis: sampling; sample handling and analysis, National Bureau of Standards Special Publication* 422. Proceedings of the 7th IMR Symposium, Gaithersburg, MD, 321-355.

Peijnenburg, W.J.G.M., Jager, T., **2003**. Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: matrix issues. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 56, 63-77.

Peng, J-F., Liu, R., Liu, J-F., He, B., Hu, X-L., Jiang, G-B., **2007**. Ultrasensitive determination of cadmium in seawater by hollow fiber supported liquid membrane extraction coupled with graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* 62, 499-503.

Pereira, A.S., Ferreira, G., Caetano, L., Martines, M.A.U., Padilha, P.M., Santos, A., Castro, G.R., **2010**. Preconcentration and determination of Cu(II) in a fresh water sample using modified silica gel as a solid-phase extraction adsorbent. *Journal of Hazardous Materials* 175, 399-403.

Pérez-Bendito, D., Rubio, S., **1999**. Comprehensive Analytical Chemistry. Volume XXXII, Environmental Analytical Chemistry. Elsevier Science, The Netherlands.

Periáñez, R., **2012**. Modelling the environmental behaviour of pollutants in Algeciras Bay (south Spain). *Marine Pollution Bulletin* 64, 221-232.

Pesavento, M., Alberti, G., Biesuz, R., **2009**. Analytical methods for determination of free metal ion concentration, labile species fraction and metal complexation capacity of environmental waters: A review. *Analytica Chimica Acta* 631, 129-141.

Pingarrón-Carrazón, J.M., Sánchez-Batanero, P., **2003**. Química Electroanalítica. Fundamentos y aplicaciones. Ed. Síntesis, Madrid.

Pinheiro, J.P., Domingos, R., Lopez, R., Brayner, R., Fiévet, F., Wilkinson, K., **2007**. Determination of diffusion coefficients of nanoparticles and humic substances using scanning stripping chronopotentiometry (SSCP). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 295, 200-208.

Pinheiro, J.P., Domingos, R.F., Minor, M., van Leeuwen, H.P., **2006**. Metal speciation dynamics in colloidal ligand dispersions. Part 3: Lability features of steady-state systems. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 596, 57-64.

Pinheiro, J.P., Minor, M., van Leeuwen, H.P., **2005**. Metal speciation dynamics in colloidal ligand dispersions. *Langmuir* 21, 8635-8642.

Pinheiro, J.P., van Leeuwen, H.P., **2004**. Scanned stripping chronopotentiometry of metal complexes: lability diagnosis and stability computation. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 570, 69-75.

Plan de Calidad Ambiental del Campo de Gibraltar. Fase I, **2001**. Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía.

- Plan de Calidad Ambiental del Campo de Gibraltar. Fase I, Sexto informe, **2005**. Estudio de la calidad ambiental del campo de Gibraltar (Medio ambiente acuático y contaminación acústica). Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía.
- Plan de Calidad Ambiental del Campo de Gibraltar. Fase II, Segundo informe, **2006**. Diagnóstico ambiental del medio acuático y evaluación de la contaminación acústica en el Campo de Gibraltar. Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía.
- Polizzotto, M.L., Kocar, B.D., Benner, S.G., Sampson, M., Fendorf, S., **2008**. Near-surface wetland sediments as a source of arsenic release to ground water in Asia. *Nature* 454, 505-508.
- Poole, C. F., **2003**. New trends in solid-phase extraction. *Trends in Analytical Chemistry* 22, 362-373.
- Poole, C.F., **2000**. Solid-Phase Extraction with Discs. En Encyclopedia of Separation Science (Eds.: Wilson, I.; Poole, C.; Cooke, M.) Academic Press (Elsevier), Amsterdam, 4141-4148.
- Portella, C.M.M.A., Tristão, M.L.B., Felcman, J., **2006**. Evaluation of the possibility of contamination of sea water by metal ions present in fuel oil. *Fuel* 85, 2162-2170.
- Porteous, A., **2008**. Dictionary of environmental science and technology, 4th Ed. John Wiley & Sons, Chichester (England).
- Possanzini, M., Dipalo, V., **1997**. Determination of formaldehyde and acetaldehyde in air by HPLC with fluorescence detection. *Chromatographia* 46, 235-240.
- Pozebon, D., Santos, J.H.Z., Peralba, M.C.R., Maia, S.M., Barrionuevo, S., Pizzolato, T.M., **2009**. Metals, arsenic and hydrocarbons monitoring in marine sediment during drilling activities using NAFs. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 56, 22-31.
- Pueyo, M., Mateu, J., Rigol, A., Vidal, M., López-Sánchez, J.F., Rauret, G., **2008**. Use of the modified BCR three-step sequential extraction procedure for the study of trace element dynamics in contaminated soils. *Environmental Pollution* 152, 330-341.
- Pueyo, M., Rauret, G., Lück, D., Yli-Halla, M., Muntau, H., Quevauviller, Ph., López-Sánchez, J.F., **2001**. Certification of the extractable contents of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in a freshwater sediment following a collaboratively tested and optimised three-step sequential procedure. *Journal of Environmental Monitoring* 3, 243-250.
- Pyle, G., Rajotte, J.M., Couture, P., **2005**. Effects of industrial metals on wild fish populations along a metal contamination gradient. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61, 287-312.
- Pyrzynska, K., **2012**. Redox speciation of chromium using sorption-based systems. *Trends in Analytical Chemistry* 32, 100-112.
- Pyrzynska, K., **2012**. Sorbent materials for separation and preconcentration of gold in environmental and geological samples-A review. *Analytica Chimica Acta* 741, 9-14.
- Quevauviller, Ph., **1998**. Operationally defined extraction procedures for soil and sediment analysis II. Certified reference materials. *Trends in Analytical Chemistry* 17(10), 632-642.
- Quevauviller, Ph., Rauret, G., López-Sánchez, J.F., Rubio, R., Ure, A.M., Muntau, H., **1997**. Certification of the trace metal extractable contents in a sediment reference material (CRM 601) following a three-step sequential extraction procedure. *Science of the Total Environment* 205, 223-234.
- Quevauviller, Ph., Rauret, G., Muntau, H., Ure, A.M., Rubio, R., López-Sánchez, J.F., Fielder, H.D., Griepink,

- B., **1994**. Evaluation of a sequential extraction procedure for the determination of extractable trace metal contents in sediments. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* 349, 808-814.
- Quevauvillier, Ph., Ure, A.M., Muntau, H., Griepnik, B., **1993**. Improvement of analytical measurements within the BCR-programme: single and sequential extraction procedures applied to soil and sediment analysis. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 51, 129-134.
- Radojevic, M., Bashkin, V.N., **2006**. Practical environmental analysis. The Royal Society of Chemistry, 2nd Ed. Cambridge (England).
- Rahmi, D., Zhu, Y., Fujimori, E., Umemura, T., Haraguchi, H., **2007**. Multielement determination of trace metals in seawater by ICP-MS with aid of down-sized chelating resin-packed minicolumn for preconcentration. *Talanta* 72, 600-606.
- Raj, S.M., Jayaprakash, M., **2008**. Distribution and enrichment of trace metals in marine sediments of Bay of Bengal, off Ennore, south-east coast of India. *Environmental Geology* 56, 207-217.
- Raju, C., Srinivasan, S., Subramanian, M., **2005**. New multi-dentate ion-selective AXAD-16-MOPPA polymer for the preconcentration and sequential separation of U(VI), Th(IV) from rare earth matrix. *Separation Science and Technology* 40, 2213-2230.
- Rashed, M.N., **2001**. Monitoring of environmental heavy metals in fish from Nasser Lake. *Environment International* 27, 27-33.
- Rauret, G., López-Sánchez, J.F., Sahuquillo, A., Rubio, R., Davidson, C.M., Ure, A.M., Quevauvillier, Ph., **1999**. Improvement of the BCR three step sequential extraction procedure prior to the certification of the new sediment and soil reference materials. *Journal of Environmental Monitoring* 1, 57-61.
- Riede, K., **2004**. Global register of migratory species - from global to regional scales. Final Report of the R&D-Projekt 808 05 081. Federal Agency for Nature Conservation, Bonn, Germany.
- Rocha, L.S., Companys, E., Galceran, J., Carapuça, H.M., Pinheiro, J.P., **2010**. Evaluation of thin mercury film rotating disk electrode to perform absence of gradients and Nernstian equilibrium stripping (AGNES) measurements. *Talanta* 80, 1881-1887.
- Rocha, L.S., Pinheiro, J.P., Carapuça, H.M., **2007**. Evaluation of nanometer thick mercury film electrodes for stripping chronopotentiometry. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 610, 37-45.
- Rodgers, R.S., Meites, L., **1968**. Corrections for double-layer charging in chronopotentiometry. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 16, 1-11.
- Rodríguez Baena, J., **2001**. Los fullerenos y derivados en el ámbito de la especiación medioambiental. Tesis Doctoral, Universidad de Córdoba.
- Rosas Rodríguez, H., **2001**. Estudio de la contaminación por metales pesados en la cuenca del Llobregat. Tesis doctoral, Universitat Politècnica de Catalunya.
- Roychoudhury, A.N., Starke, M.F., **2006**. Partitioning and mobility of trace metals in the Blesbokspuit, Impact assessment of dewatering of mine waters in the East Rand, South Africa. *Applied Geochemistry* 21, 1044-1063.
- Rue, E., Bruland, K., **2001**. Domoic acid binds iron and copper: a possible role for the toxin produced by the marine diatom *Pseudo-nitzschia*. *Marine Chemistry* 76, 127-134.

- Rus Pezzi, I., 2011. Estación depuradora de aguas residuales de Algeciras. Dossier 54. (<http://www.reteonline.org/images/stories/archivos/portus/pdf/24/Rus%20Pezzi.pdf>)
- Russell, I.M., Burton, S.G., **1999**. Development and demonstration of an immobilised-polyphenol oxidase bioprobe for the detection of phenolic pollutants in water. *Analytica Chimica Acta* 389, 161-170.
- Ruyters, S., Mertens, J., Vassilieva, E., Dehandschutter, B., Poffijn, A., Smolders, E., **2011**. The red mud accident in Aajka (Hungary): plant toxicity and trace metal bioavailability in red mud contaminated soil. *Environmental Science and Technology* 45, 1616-1622.
- Safavi, A., Maleki, N., Farjami, F., **2001**. Selective kinetic spectrophotometric determination of copper at nanograms per milliliter level. *Talanta* 54, 397-402.
- Sahan, S., Sahin, U., **2011**. An automated solid phase extraction coupled with electrothermal atomic absorption spectrometric determination of Pb(II) in high salt content samples. *Talanta* 86, 128-132.
- Sahuquillo, A., López-Sánchez, J.F., Rubio, R., Rauret, G., Thomas, E.A., Davidson, C.M., Ure, A.M., **1999**. Use of certified reference materials for extractable trace metals to assess sources of uncertainty in the BCR three-stage sequential extraction procedure. *Analytica Chimica Acta* 382(3), 317-327.
- Sahuquillo, A., Rigol, A. and Rauret, G., **2003**. Overview of the use of leaching/extraction tests for risk assessment of trace metals in contaminated soils and sediments, *Trends in Analytical Chemistry* 22, 152-159.
- Salomons, W., **1993**. Adoption of common schemes for single and sequential extraction of trace metal in soils and sediments. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 51(1-4), 3-4.
- Sánchez Trujillo, I., Vereda Alonso, E., García de Torres, A., Cano Pavón, J.M., **2012**. Development of a solid phase extraction method for the multielement determination of trace metals in natural waters including sea-water by FI-ICP-MS. *Microchemical Journal* 101, 87-94.
- Sander, S., Navrátil, T., Bašová, P., Novotný, L., **2002**. Electrosorption of chromium-diethylenetriaminepentaacetic acid on mercury electrode under voltammetric conditions. *Electroanalysis* 14, 1133-1137.
- Sander, S., Navrátil, T., Novotný, L., **2003**. Study of the complexation, adsorption and electrode reaction mechanisms of chromium(VI) and (III) with DTPA under adsorptive stripping voltammetric conditions. *Electroanalysis* 15, 1513-1521.
- Sankar, C., Pandiarajan, K., **2010**. Synthesis and anti-tubercular and antimicrobial activities of some 2*r*,4*c*-diaryl-3-azabicyclo[3.3.1]nonan-9-one N-isonicotinoylhydrazone derivatives *European Journal of Medicinal Chemistry* 45, 5480-5485.
- Santos-Echeandía, J., Caetano, M., Brito, P., Canario, J., Vale, C., **2012**. The relevance of defining trace metal baselines in coastal waters at a regional scale: The case of the Portuguese coast (SW Europe). *Marine Environmental Research* 79, 86-99.
- Sastry, C.S.P., Naidu, P.Y., Murty, S.S.N., **1997**. Spectrophotometric methods for the determination of omeprazole in bulk form and pharmaceutical formulations. *Talanta* 44, 1211-1217.
- Sastry, C.S.P., Rekha, T.V., Satyanarayana, A., **1998**. Spectrophotometric Determination of Clozapine in Pharmaceuticals. *Microchimica Acta* 128, 201-205.
- Savini, L., Chiasserini, L., Travagli, V., Pellerano, C., Novellino, E., Cosentino, S., Pisano, **2004**. New a-(N)-

heterocyclichydrazones: evaluation of anticancer, anti-HIV and antimicrobial activity. *European Journal of Medicinal Chemistry* 39, 113-122.

Schulze, G., Bönigk, W., Frenzel, W., **1985**. Matrix exchange technique for the simultaneous determination of several elements in flow injection potentiometric stripping analysis. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 322, 255-260.

Serrano, N., Díaz-Cruz, J.M., Ariño, C., Esteban, M., Puy, J., Companys, E., Galceran, J., Cecilia, J., **2007**. Full-wave analysis of stripping chronopotentiograms at scanned deposition potential (SSCP) as a tool for heavy metal speciation: Theoretical development and application to Cd(II)-phthalate and Cd(II)-iodide systems. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 600, 275-284.

Serrano, O., Mateo, M.A., Dueñas-Bohórquez, A., Renom, P., López-Sáez, J.A., Martínez Cortizas, A., **2011**. The Posidonia oceanica marine sedimentary record: A Holocene archive of heavy metal pollution. *Science of the Total Environment* 409, 4831-4840.

Shakerian, F., Dadfarnia, S., Haji Shabani, A.M., **2012**. Synthesis and application of nano-pore size ion imprinted polymer for solid phase extraction and determination of zinc in different matrices. *Food Chemistry* 134, 488-493.

Shamsipur, M., Avanes, A., Rofouei, M.K., Sharghi, H., Aghapour, G., **2001**. Solid phase extraction and determination of ultra trace amounts of copper(II) using octadecyl silica membrane disks modified by 11-hydroxynaphthacene-5,12-quinone and flame atomic absorption spectrometry. *Talanta* 54, 863-869.

Shamsipur, M., Avanes, A., Sharghi, H., **2004**. Solid phase extraction and pre-concentration of sub-ppb level of copper in aqueous samples on octadecyl silica membrane disks modified with a new anthraquinone derivative and its determination by atomic absorption spectrometry. *Separation Science and Technology* 39,113-124.

Shamsipur, M., Ghiasvand, A.R., Sharghi, H., Naeimi, H., **2000**. Solid phase extraction of ultra trace copper(II) using octadecyl silica membrane disks modified by a naphthol-derivative Schiff's base. *Analytica Chimica Acta* 408, 271-277.

Sharma, R.K., Agrawal, M., Marshall, F.M., **2008**. Heavy metal (Cu, Zn, Cd, and Pb) contamination of vegetables in urban India, A case study in Varanasi. *Environmental Pollution* 154, 254-263.

Sharma, R.N., Sharma, K.P., Dikshit, S.N., **2011**. Synthesis, characterization and biological activities of some new acid hydrazones derived from 2-[(N-benzoyl) 2, 5-dichloroanilido] acetohydrazide. *International Journal of ChemTech Research* 3, 381-390.

Shokrolahi, A., Ghaedi, M., Shabani, R., Montazerzohori, M., Chehreh, F., Soylak, M., Alipour S., **2010**. A preconcentration procedure for copper, nickel and chromium ions in some food and environmental samples on modified Diaion SP-850. *Food and Chemical Toxicology* 48, 482-489.

Sidhu, P., Garg, M., L., Morgenstern, P., Vogt, J., Butz, T., Dhawan, D.K., **2004**. Role of zinc in regulating the levels of hepatic elements following nickel toxicity in rats. *Biological Trace Element Research* 102(1-3), 161-172.

Skoog, D.A., Holler, F.J. Nieman, T.A., **2001**. Principios de Análisis Instrumental, 5ª Ed., McGraw Hill, Madrid.

Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R., **2005**. Fundamentals of Analytical Chemistry. 8th Edition, International Thomson Editors.

- Smith, A.H., Lingas, E.O., Rahman, M., **2000**. Contamination of drinking-water by arsenic in Bangladesh: A public health emergency. *Bulletin of the World Health Organization* 78, 1093-1106.
- Soares, H.M.V.M., Conde, P.C.F.L., Almeida, A.A.N., Vasconcelos, M.T.S.D., **1999**. Evaluation of n-substituted aminosulfonic acid pH buffers with a morpholinic ring for cadmium and lead speciation studies by electroanalytical techniques. *Analytica Chimica Acta* 394, 325-335.
- Sohrin, Y., Urushihara, S., Nakatsuka, S., Kono T., Higo, E., Minami, T., Norisuye, K., Umetani, S., **2008**. Multielemental determination of GEOTRACES key trace metals in seawater by ICPMS after preconcentration using an ethylenediaminetriacetic acid chelating resin. *Analytical Chemistry* 80, 6267-6273.
- Soltan, M.E., Moalla, S.M.N., Rashed, M.N., Fawzy, E.M., **2005**. Physicochemical characteristics and distribution of some metals in the ecosystem of Lake Nasser, Egypt. *Toxicological and Environmental Chemistry* 87, 167-197.
- Soylak, M., Tuzen, M., **2006**. Diaion SP-850 resin as a new solid phase extractor for preconcentration-separation of trace metal ions in environmental samples. *Journal of Hazardous Materials* 137, 1496-1501.
- Soylak, M., Unsal, Y.E., Kizil, N., Aydin, A., **2010**. Utilization of membrane filtration for preconcentration and determination of Cu(II) and Pb(II) in food, water and geological samples by atomic absorption spectrometry. *Food and Chemical Toxicology* 48, 517-521.
- Sreedhar, K., Sastry, C.S.P., Reddy, M.N., Sankar, D.G., **1996**. Spectrophotometric methods for the determination of prazosin hydrochloride in tablets. *Talanta* 43, 1847-1855.
- Srivastava V., Song, Y., Bhatti, K., James, R.D., **2011**. The direct conversion of heat to electricity using multiferroic alloys. *Advanced Energy Materials* 1, 97-104.
- Stachowitsch, M., **2003**. Research on intact marine ecosystems: a lost era. *Marine Pollution Bulletin* 46, 801-805.
- STATISTICA (data analysis software system) version 7 (2004, Statsoft, Inc. USA)
- Strickland, J. D. H., Parsons, T. R., **1977**. A Practical Handbook of Seawater Analysis, Minister of Supply and Services.
- Suresh, G., Sutharsan, P., Ramasamy, V., Venkatachalapathy, R., **2012**. Assessment of spatial distribution and potential ecological risk of the heavy metals in relation to granulometric contents of Veeranam lake sediments, India. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 84, 117-124.
- Sutherland, R.A., **2010**. BCR®-701: A review of 10-years of sequential extraction analyses. *Analytica Chimica Acta* 680, 10-20.
- Suvarapu, L.N., Seo, Y.K., Baek, S.O., Ammireddy, V.R., **2012**. Review on analytical and biological applications of hydrazones and their metal complexes. *E-Journal of Chemistry* 9, 1288-1304.
- Takata, H., Aono, T., Tagami, K., Uchida, S., **2010**. Processes controlling cobalt distribution in two temperate estuaries, Sagami Bay and Wakasa Bay, Japan. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 89, 294-305.
- Tarley, C.R.T., Coltro, W.K.T., Matsushita, M., De Souza, N.E., **2001**. Characteristic levels of some heavy metals from Brazilian canned sardines (*Sardinella brasiliensis*). *Journal of Food Composition and Analysis* 14, 611-617.
- Templeton, D.M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L.G. Muntau, H., van Leeuwen, H.P., Lobinski, A.R., **2000**. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions,

structural aspects, and methodological approaches (IUPAC recommendation 2000). *Pure and Applied Chemistry* 72, 1453-1470.

Tercier-Waeber, M.L., Taillefert, M. **2008**. Remote in situ voltametric techniques to characterize the biogeochemical cycling of trace metals in aquatic systems. *Journal of Environmental Monitoring* 10, 30-50.

Tessier, A., Campbell, P.G.C., Bisson, M., **1979**. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals, *Analytical Chemistry* 51, 844-851.

The Cuong, D., Obbard, J.P., **2006**. Metal speciation in coastal marine sediments from Singapore using a modified BCR-sequential extraction procedure. *Applied Geochemistry* 21, 1335-1346.

Thurman, E. M., Snively, K., **2000**. Advances in solid-phase extraction disks for environmental chemistry. *Trends in Analytical Chemistry* 19, 18-26.

Tobiasz, A., Walas, S., Landowska, L., Konefał-Góral, J., **2012**. Improvement of copper FAAS determination conditions via preconcentration procedure with the use of salicylaldehyde complex trapped in polymer matrix. *Talanta* 96, 82-88.

Tolun, L.G., Okay, O.S., Gaines, A.F., Tolay, M., Tfrkai, H., Kiratli, N., **2001**. The pollution status and the toxicity of surface sediments in Izmit Bay (Marmara Sea), Turkey. *Environment International* 26, 163-168.

Tomiyasu, T., Matsuyama, A., Eguchi, T., Marumoto, K., Oki, K., Akagi, H., **2008**. Speciation of mercury in water at the bottom of Minamata Bay, Japan. *Marine Chemistry* 112, 102-106.

Tonietto, A.E., Grassi, M.T., **2012**. Speciation analysis of copper and zinc using differential pulse anodic stripping voltammetry. *Química Nova* 35, 170-174.

Tovar-Sánchez, A., Sañudo-Wilhelmy, S.A., Flegal, A.R., **2004**. Temporal and spatial variations in the biogeochemical cycling of cobalt in two urban estuaries: Hudson River Estuary and San Francisco Bay. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 60, 717-728.

Town, R.M., **2008**. Metal binding by heterogeneous ligands: kinetic master curves from SSCP waves. *Environmental Science & Technology* 42, 4014-4021.

Town, R.M., Pinheiro, J.P., Domingos, R., van Leeuwen, H.P., **2005**. Stripping chronopotentiometry at scanned deposition potential (SSCP). Part 6: Features of irreversible complex systems. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 580, 57-67.

Town, R.M., van Leeuwen, H.P., **2001**. Fundamental features of metal ion determination by stripping chronopotentiometry. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 509, 58-65.

Town, R.M., van Leeuwen, H.P., **2002**. Effects of adsorption in stripping chronopotentiometric metal speciation analysis. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 523, 1-15.

Town, R.M., van Leeuwen, H.P., **2003**. Stripping chronopotentiometry at scanned deposition potential (SSCP). Part 2. Determination of metal ion speciation parameters. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 541, 51-65.

Town, R.M., van Leeuwen, H.P., **2004a**. Depletive stripping chronopotentiometry: a major step forward in electrochemical stripping techniques for metal ion speciation analysis. *Electroanalysis* 16, 458-471.

Town, R.M., van Leeuwen, H.P., **2004b**. Stripping chronopotentiometry at scanned deposition potential (SSCP). Part 5. Features of multi-metal systems. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 573, 147-157.

- Town, R.M., Yezek, L.P., van Leeuwen, H.P., **2006**. Stripping chronopotentiometry at scanned deposition potential (SSCP). Part 8. Metal speciation analysis in gels. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 589, 203-211.
- Turekian, K.K., Wedepohl, K.H., **1961**. Distribution of the elements in some major units of the earth's crust. *Geological Society of America Bulletin* 72, 175-192.
- Tutunji, M.F., **1996**. Determination of mercury in biological fluids by potentiometric stripping analysis *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 356, 90-95.
- Tuzen, M., Melek, E., Soylak, M., **2006**. Celtek clay as sorbent for separation-preconcentration of metal ions from environmental samples. *Journal of Hazardous Materials* 136, 597-603.
- Tuzen, M., Saygi, K.O., Soylak, M., **2008**. Solid phase extraction of heavy metal ions in environmental samples on multiwalled carbon nanotubes. *Journal of Hazardous Materials* 152, 632-639.
- U.S. EPA, **2010**. National Trends in Lead Levels. <http://www.epa.gov/air/airtrends/lead.html>.
- Uluturhan, E., Kontas, A., Can, E., **2011**. Sediment concentrations of heavy metals in the Homa Lagoon (Eastern Aegean Sea): Assessment of contamination and ecological risks. *Marine Pollution Bulletin* 62, 1989-1997.
- Ure, A.M., Davidson, C.M., **2002**. Chemical Speciation in the environment, 2 edition. Ed. Blackwell Science, Oxford (England).
- Ure, A.M., Quevauviller, Ph., Muntau, H., Griepink, B., **1993a**. Improvements in the determinations of extractable contents of trace metals in soils and sediments prior to certification, EUR 1473 EN, Commission of the European Communities, Brussels-Luxembourg, pp 85.
- Ure, A.M., Quevauviller, Ph., Muntau, H., Griepink, B., **1993b**. Speciation of heavy metals in soils and sediments. An account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under the auspices of the BCR of the Commission of the European Communities. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 51, 135-51.
- US EPA (United States Environmental Protection Agency), **2002**. National Recommended Water Quality Criteria. EPA-822-r-02-047, Office of Science and Technology.
- Usero, J., González-Regalado, E., Gracia, I., **1996**. Trace metals in the bivalve mollusc *chamelea gallina* from the Atlantic Coast of Southern Spain. *Marine Pollution Bulletin* 32, 305-310.
- Usero, J., González-Regalado, E., Gracia, I., **1997**. Trace metals in the bivalve molluscs *Ruditapes decussatus* and *Ruditapes philippinarum* from the Atlantic coast southern Spain. *Environment International* 23, 291-298.
- Usero, J., Morillo, J., Gracia, I., **2005**. Heavy metal concentrations in molluscs from the Atlantic coast of southern Spain. *Chemosphere* 59, 1175-1181.
- VA Application Note nº V-82. Different chromium species in sea water.
- Valledor de Lozoya, A. Envenenamientos por animales: animales venenosos y urticantes del mundo, Ed. Díaz de Santos S.A., Madrid, España.
- Van den Berg C.M.G., **1995**. Evidence for organic complexation of iron in seawater. *Marine. Chemistry* 50, 139-157.

- Van den Berg, C.M.G., **1985**. Determination of the zinc complexing capacity in seawater by cathodic stripping voltammetry of zinc-APDC complex ions. *Marine Chemistry* 16, 121-130.
- Van den Berg, C.M.G., Donat J.R., **1992**. Determination and data evaluation of copper complexation by organic ligands in sea water using cathodic stripping voltammetry at varying detection windows. *Analytica Chimica Acta* 257, 281-291.
- Van den Berg, C.M.G., Nimmo, M., **1987**. Determination of interactions of nickel with dissolved organic material in seawater using cathodic stripping voltammetry. *The Science of the Total Environment* 60, 185-195.
- Van Gestel, C., van Brummelen, T.C., **1996**. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for the redefinition of terms. *Ecotoxicology* 5, 217-225.
- Van Leeuwen, H.P., **2001**. Revisited: The Conception of Lability of Metal Complexes. *Electroanalysis* 13, 826-830.
- Van Leeuwen, H.P., Town, R.M., **2002a**. Stripping chronopotentiometry for metal ion speciation analysis at a microelectrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 523, 16-25.
- Van Leeuwen, H.P., Town, R.M., **2002b**. Stripping chronopotentiometry at scanned deposition potential (SSCP). Part 1. Fundamental features. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 536, 129-140.
- Van Leeuwen, H.P., Town, R.M., **2002c**. Elementary features of depletive stripping chronopotentiometry. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 535, 1-9.
- Van Leeuwen, H.P., Town, R.M., **2003a**. Electrochemical metal speciation analysis of chemically heterogeneous samples: the outstanding features of stripping chronopotentiometry at scanned deposition potential. *Environmental Science & Technology* 37, 3945-3952.
- Van Leeuwen, H.P., Town, R.M., **2003b**. Stripping chronopotentiometry at scanned deposition potential (SSCP). Part 3. Irreversible electrode reactions. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 556, 93-102.
- Van Leeuwen, H.P., Town, R.M., **2004**. Stripping chronopotentiometry at scanned deposition potential (SSCP). Part 4. The kinetic current regime. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 561, 67-74.
- Van Leeuwen, H.P., Town, R.M., **2005**. Kinetic limitations in measuring stabilities of metal complexes by competitive ligand exchange-adsorptive stripping voltammetry (CLE-AdSV). *Environmental Science & Technology* 39, 7217-7225.
- Van Leeuwen, H.P., Town, R.M., **2006**. Stripping chronopotentiometry at scanned deposition potential (SSCP). Part 7. Kinetic currents for ML_2 complexes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 587, 148-154.
- Van Leeuwen, H.P., Town, R.M., Buffle, J., Cleven, R.F.M.J., Davison, W., Puy, J., Van Riemsdijk, W.H., Sigg, L., **2005**. Dynamic speciation analysis and bioavailability of metals in aquatic systems. *Environmental Science & Technology* 39, 8545-8556.
- VanLoon, G.W., Duffy, S.J., **2011**. Environmental Chemistry, a global perspective. Oxford University Press, New York.
- Varol, M., **2011**. Assessment of heavy metal contamination in sediments of the Tigris River (Turkey) using pollution indices and multivariate statistical techniques. *Journal of Hazardous Materials* 195, 355-364.

- Vasconcelos, M.T.S.D., Leal, M.F.C., Van der Berg, C.M.G., **2002**. Influence of the nature of the exudates released by different marine algae on the growth, trace metal uptake and exudation of *Emiliania huxleyi* in natural seawater. *Marine Chemistry* 77, 187-210.
- Vicente Martorell, J.J., **2010**. Biodisponibilidad de metales pesados en dos ecosistemas acuáticos de la costa suratlántica andaluza afectados por contaminación difusa. Tesis doctoral, Universidad de Cádiz.
- Vicente-Martorell, J.J., Galindo-Riaño, M.D., García-Vargas, M., Granado-Castro, M.D., **2009**. Bioavailability of heavy metals monitoring water, sediments and fish species from a polluted estuary. *Journal of Hazardous Materials* 162, 823-836.
- Vierendeels, G., Reniers, G.L.L., Ale, B.J.M., **2011**. Modeling the major accident prevention legislation change process, *Safety Science* 49, 513-521.
- Vyas, A., Patitungkho, S., Jamadar, A., Adsule, S., Padhye, S., Ahmad, S., Sarkar, F.H., **2012**. ATRA-hydrazonate derivatives and their copper complexes against hormone-dependent (MCF-7), hormone-independent (MDA-MB-231 and BT-20) breast cancer and androgen-independent (PC3) prostate cancer cell lines. *Inorganic Chemistry Communications* 23, 17-20.
- Vyskocil, V., Barek, J., **2009**. Mercury Electrodes—Possibilities and Limitations in Environmental Electroanalysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 39, 173–188.
- Wedepohl, K.H., **1995**. The composition of the continental crust. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 59, 1217-1232.
- Welz, B., **1985**. Atomic Absorption Spectrometry, VCH, Amsterdam.
- Wen-Xiong Wang Corresponding author contact information
- WHO, **2000**. Air Quality Guidelines for Europe, Chapter 6.10, Nickel, WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark.
- Williams, A., Hoy, T., Jacobs, A., **1982**. Pyridoxal complexes as potential chelating agents for oral therapy in transfusional iron overload. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 34, 730-732.
- Witt, M., Jickells, T., **2005**. Copper complexation in marine and terrestrial rain water. *Atmospheric Environment* 39, 7657-7666.
- Witt, M., Skrabal, S., Kieber, R., Willey, J., **2007**. Copper complexation in coastal rainwater, southeastern USA. *Atmospheric Environment* 41, 3619-3630.
- World Health Organization, **2007**. Lead. Health risks of heavy metals from long-range transboundary air pollution. Copenhagen: World Health Organization, 43-72.
- Wu, J., Jin, M., **2009**. Competitive ligand exchange voltammetric determination of iron organic complexation in seawater in two-ligand case: Examination of accuracy using computer simulation and elimination of artefacts using iterative non-linear multiple regression. *Marine Chemistry* 114, 1-10.
- Yamamoto, K., Sakamoto, H., Yonetani, A., Shirasaki, T., **2007**. Determination of trace metals in salt and sea water by means of ICP-AES and MIP-MS with preconcentration using the polyaminopolycarboxylic acid type chelating resin solid phase extraction. *Nippon Kaisui Gakkaishi* 61, 260.
- Yaman, M., **2005**. The improvement of sensitivity in lead and cadmium determinations using flame atomic absorption spectrometry. *Analytical Biochemistry* 339, 1-8.

- Yamini, Y., Tamaddon, A., **1999**. Solid-phase extraction and spectrophotometric determination of trace amounts of copper in water samples. *Talanta* 49, 119-124.
- Yanagi, T., Ducrotoy, J.P., **2003**. Toward coastal zone management that ensures coexistence between people and nature in the 21st century. *Marine Pollution Bulletin* 47, 1-4.
- Yoe, J.H., Jones, A.L., **1944**. Colorimetric determination of iron with disodium-1,2-dihydroxybenzene-3,5-disulfonate. *Industrial and Engineering Chemistry Analytical Edition* 16, 111-115.
- Zavarise, F., Companys, E., Galceran, J., Alberti, G., Profumo, A., **2010**. Application of the new electroanalytical technique AGNES for the determination of free Zn concentration in river water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 397, 389-394.
- Zhang, L., Chang, X., Li, Z., He, Q., **2010**. Selective solid-phase extraction using oxidized activated carbon modified with triethylenetetramine for preconcentration of metal ions. *Journal of Molecular Structure* 964, 58-62.
- Zhou, H.Y., Cheung, R.Y.H., Chan, K.M., Wong, M.H., **1998**. Metal concentrations in sediments and *Tilapia* collected from inland water of Hong Kong. *Water Research* 32, 3331-3340.
- Zhu, Y., **2007**. Development of chelating resin-packed minicolumn for multielement preconcentration and determination of trace metals in natural water. *Bunseki Kagaku* 56, 895-896.
- Zhu, Y., Itoh, A., Fujimori, E., Umemura, T., Haraguchi, H., **2005a**. Multielement determination of trace metals in seawater by inductively coupled plasma mass spectrometry after tandem preconcentration using a chelating resin. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 78, 659-667.
- Zhu, Y., Itoh, A., Fujimori, E., Umemura, T., Haraguchi, H., **2006**. Determination of rare earth elements in seawater by ICP-MS after preconcentration with a chelating resin-packed minicolumn. *Journal of Alloys and Compounds* 408, 985-988.
- Zhu, Y., Itoh, A., Haraguchi, H., **2005b**. Multielement determination of trace metals in seawater by ICP-MS using a chelating resin-packed minicolumn for preconcentration. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 78, 107-115.
- Zurek, G., Karst, U., **2000**. 2,4-Dinitro-3,5,6-trideuterophenylhydrazones for the quantitation of aldehydes and ketones in air samples by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 869, 251-259.